

# **EINFLUSS SELEKTIVER UND NICHT-SELEKTIVER INHIBITION DER STICKSTOFF (NO)-SYNTHASEN AUF MAKRO- UND MIKROZIRKULATION IN EINEM EXPERIMENTELLEN MODELL DES SEPTISCHEN SCHOCKS**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität  
Gießen

vorgelegt von  
Daniel Maring  
aus Bonn

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
Direktor: Prof. Dr. W. Seeger  
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter:	PD Dr. R. Schermuly
Gutachterin:	Frau Prof. Dr. R. Füssle
Tag der Disputation:	14.11.2005

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<hr/>		
<b>1.1</b>	<b>Sepsis</b>	<b>1</b>
1.1.1	Stoffwechsel bei der Sepsis	3
<b>1.2</b>	<b>Gegenwärtige Therapiekonzepte</b>	<b>4</b>
<b>1.3</b>	<b>NO-Metabolismus</b>	<b>5</b>
<b>1.4</b>	<b>NO-Synthasen (NOS 1-3)</b>	<b>8</b>
<b>1.5</b>	<b>Rolle der cNOS bei der Sepsis</b>	<b>10</b>
<b>1.6</b>	<b>Wie wird die iNOS hochreguliert?</b>	<b>11</b>
<b>1.7</b>	<b>Der Transkriptionsfaktor NF-κB</b>	<b>12</b>
<b>1.8</b>	<b>Toxische Effekte von NO</b>	<b>17</b>
1.8.1	Organ-Dysfunktionen	18
1.8.1.1	Niere	18
1.8.1.2	Leber	18
1.8.1.3	Myokard	19
1.8.1.4	Septischer Darm	21
<b>1.9</b>	<b>LPS und glatte Muskulatur</b>	<b>24</b>
<b>1.10</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>26</b>

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
2.1	Beschreibung des verwendeten Ganztiermodells	27
2.1.1	Versuchstiere	27
2.1.2	Präparation	28
2.2	Ansetzen des Lipopolysaccharids	30
2.3	Blutentnahme	31
2.4	Messwertregistrierung	31
2.5	Ventilation	32
2.6	EMPHO II ( <u>E</u> rlanger <u>M</u> ikrolichtleiter-Spektro- <u>P</u> hotometer)	33
2.7	Therapie-Interventionen	34
2.7.1	Volumen-Therapie	34
2.7.2	Katecholamin-Therapie	35
2.7.3	L-NMMA	35
2.7.4	1400W	35
2.8	Statistische Auswertung	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>36</b>
3.1	Kontroll- und Standardbedingungen	36
3.2	Therapie der Hypotension	37
3.3	Rechtsventrikuläre Druckverhältnisse	39
3.4	Mikrozirkulation	40
3.5	Entwicklungen der Plasma-Nitrat-/Nitrit-Spiegel unter verschiedenen Therapieregimen	43
3.6	Plasma-Laktat-Spiegel und pH-Werte	44
3.7	Tabelle 1: Arterielle Blutgase und Laktatkonzentration	46

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>47</b>
----------	-------------------	-----------

---

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>58</b>
----------	------------------------	-----------

---

<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>62</b>
----------	------------------	-----------

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 SEPSIS - SEPTISCHER SCHOCK

Die Sepsis stellt ein Krankheitsbild dar, welches insbesondere in der Intensivmedizin eine große Bedeutung besitzt. Trotz umfangreicher neuer pathophysiologischer Erkenntnisse und moderner Therapieansätze in den letzten Jahren, ist eine Zunahme der Inzidenz des septischen Schocks und keine Senkung der Mortalitätsrate zu beobachten. Gerade wegen der immer noch hohen Letalität von 40 bis 60 % ist es dringend notwendig, neue Therapieansätze zu entwickeln. Die Inzidenz der Sepsis beträgt laut Angaben der Paul-Ehrlich-Gesellschaft aus dem Jahre 2001 etwa 5 bis 15 auf 1000 Krankenhauspatienten. Die Inzidenz der Sepsis-Fälle im Bereich der Intensivpatienten wird in der Literatur mit 3-5 % angegeben. Es werden jedoch auch höhere Inzidenzen genannt. Hierfür sind die unterschiedlichen Kriterien der Sepsis-Diagnose und -Definition sowie die Zusammensetzung des Krankengutes hinsichtlich der Grunderkrankungen verantwortlich zu machen.

Die klassische Definition der Sepsis stammt von SCHOTTMÜLLER aus dem Jahre 1914 [87]: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Diese Definition unterliegt einem stetigen Wandel. Eine weitere, dem heutigen Kenntnisstand besser angepasste Definition der mikrobiellen Sepsis, stammt von SCHUSTER [88]: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Erreger und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die grossen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“

Diese Definition stützt sich auf die fünf Grundpfeiler des schweren septischen Krankheitsprozesses: Die septische Infektionsquelle als Ausgangspunkt, die Invasion von Mikroorganismen, die Freisetzung ihrer Bestandteile oder Toxine, die Ausschüttung von Mediatoren, Zellfunktionsstörungen und morphologische Destruktion von Zellmembranen und Zellstrukturen als Grundlage der Organschädigung und die Multiorganinsuffizienz, als deren klinischer Ausdruck das Multiorganversagen [30].

Eine amerikanische Konsensuskonferenz aus Vertretern der Gesellschaft für Thoraxchirurgie und der Gesellschaft für Intensivmedizin (American College of Chest Physicians und Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee) stellte 1991 präzise Definitionen der Begriffe Sepsis und des Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) anhand einfacher klinischer Parameter auf. Der Ausdruck des SIRS beschreibt demzufolge einen Symptomkomplex, der durch das Zustandekommen von zwei oder mehr der folgenden Kriterien definiert ist:

- (1) Fieber über 38° C oder in seltenen Fällen Hypothermie unter 36° C
- (2) Tachykardie über 90/ min
- (3) Tachypnoe über 20/ min
- (4) Leukozytose über 12 000 oder Leukopenie unter 4 000 / mm<sup>3</sup>

Nach dieser Übereinkunft ist eine Sepsis als das Vorhandensein eines SIRS mit nachgewiesener Infektion, z.B. durch positive Blutkulturen, definiert [32]. Liegen zusätzlich zur Sepsis Symptome eines Organversagens der Lunge, Niere, Leber und/oder des Herzens vor, spricht man gemäss der amerikanischen Konsensusdefinition von einer schweren Sepsis. Daneben können aber auch das zentrale Nervensystem (ZNS), Gastrointestinaltrakt, Knochenmark, Gerinnungs- und Immunsystem betroffen sein.

Der septische Schock geht mit einem trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr anhaltendem Blutdruckabfall einher. Ein therapierefraktärer septischer Schock liegt vor, wenn der Blutdruckabfall länger als eine Stunde dauert und sich auch durch Flüssigkeitszufuhr und den Einsatz von Vasopressoren nicht beheben lässt.

Das Sepsis-Geschehen ist ein dynamischer Prozess des Übergangs vom Stadium der „einfachen“ Sepsis zur „schweren“ Sepsis bzw. in den septischen Schock mit Organdysfunktion bzw. Organversagen [30]. Die septischen Zustandsbilder kommen durch ein kompliziertes Netzwerk pro- und antiinflammatorischer Zytokine zustande, wobei eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren durch aktivierte Blutzellen, Gefäßzellen und verschiedene Parenchymzellen während der Sepsis freigesetzt werden [32,33]. Die Regulation der Expression dieser Mediatoren für die normale Hämostase und Wirtsabwehr ist ein sehr sensibler Vorgang, wohingegen eine Überexpression in einer Organschädigung, einer Organdysfunktion und Tod resultieren kann [1]. Im Sinne der kardiovaskulären Effekte ist die verminderte Ansprechbarkeit auf vasokonstriktische und vasodilatative Stimuli eines der Hauptmerkmale der Sepsis. Die verschlechterte vaskuläre Reaktion kann zu einer inadäquaten Durchblutung zu den Organen, Fehlverteilung des Blutflusses innerhalb der Organe, abnormalen mikrovaskulären Kontrolle der Gewebe-Oxygenierung und eventuellen multiplen Organdysfunktion führen [31]. Es konnte gezeigt werden, dass die Sepsis-induzierte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) für die vasokonstriktischen und vasodilatativen Defizite verantwortlich ist [34,35,36,37].

### **1.1.1 STOFFWECHSEL BEI DER SEPSIS**

Die Sepsis führt zu einem Anstieg des Ruheenergieumsatzes um bis zu 60 %. Dabei spielen zahlreiche Faktoren wie die erhöhte Körperkerntemperatur, erhöhter Sauerstoffverbrauch im verletzten Gewebe, veränderte Einstellung des Temperaturregulationszentrums im Hypothalamus und erhöhter Substratumsatz von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen eine Rolle. Insgesamt kommt es zu Verschiebungen im Mineralhaushalt. Die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels gerät u.a. wegen des Auftretens einer Resistenz der Leber gegenüber Glucose und Insulin und einer verminderten Glucoseaufnahme der peripheren insulinsensitiven Gewebe aus dem Gleichgewicht. Auch der Fettstoffwechsel unterliegt großen Veränderungen. Unter anderem kommt es durch die gesteigerte Katecholamin-Ausschüttung zu einer Freisetzung von



Fettsäuren weit über den Bedarf eines gesunden Organismus, was wiederum zur Hemmung der Glucoseverwertung beiträgt. Wegen einer beschleunigten Proteolyse im Muskel und einer erhöhten Proteinsynthese in der Leber zeigt der Proteinstoffwechsel einen Katabolismus mit negativer Bilanz. Neben dem Versagen des kardiovaskulären Systems kommt es bei einem septischen Schock zu einer signifikanten Gewebehypoxie, begleitet von einer metabolischen Azidose, einer verstärkten Glykolyse und Hyperlaktatiämie. Diese Stoffwechselveränderungen resultieren aus einem inadäquaten Flüssigkeitsersatz, einem verminderten Sauerstofftransport und/oder einer lokalen Gewebeischämie und zeigen damit einen Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechselbedingungen an.

ROSSELET *et al.* führen diese Veränderungen auf zwei mögliche Mechanismen zurück [3]. Zum einen kommt es zu Perfusionsabnormalitäten auf makro- und mikrozirkulatorischer Ebene, was zu einer Gewebeischämie und Zellanoxie führt. Zum anderen führt die gesteigerte NO-Produktion zu einer primären Verschlechterung der Mechanismen der Sauerstoffverwertung auf zellulärer Ebene, unabhängig von der Gewebedurchblutung [3]. Diese hohen NO-Konzentrationen werden als Hauptverursacher der Hypotension, der Kardiodepression und der vaskulären Hyporeaktivität beim septischen Schock gesehen [1].

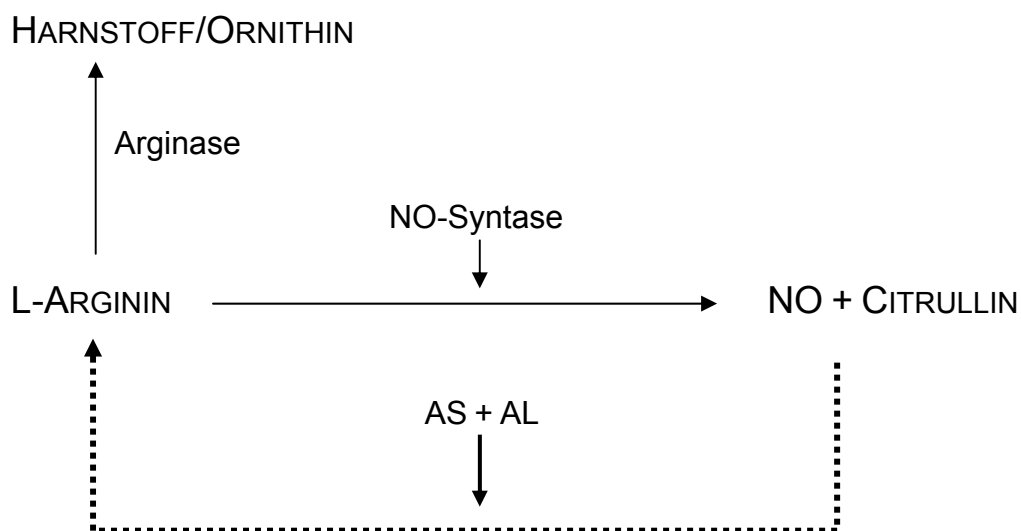
## **1.2 GEGENWÄRTIGE THERAPIEKONZEPTE**

Wegen der hohen Letalität septischer Krankheitsgeschehen ist die rasche Einleitung einer Therapie von großer Wichtigkeit. Vorrangiges Ziel dabei ist die kausale Therapie, die jedoch durch adjuvante Maßnahmen ergänzt werden muss. Die kausale Therapie umfasst die chirurgische Herdsanierung und die gezielte Antibiotikatherapie. Alle weiteren Maßnahmen, die in der Intensivmedizin zur Sepsistherapie zum Einsatz kommen, werden unter dem Begriff „adjuvante Sepsistherapie“ zusammengefasst. Darunter fallen unter anderem die Volumensubstitution, die Gabe vasoaktiver Substanzen, Sauerstoff-(O<sub>2</sub>)-Zufuhr mit mechanischer Beatmung, eine Blutkomponententherapie mit Unterstützung des Gerinnungssystems und eine Unterstützung der Nierenfunktion.

Da es zu einer ausgeprägten Gewebhypoxie kommt, ist nach SHOEMAKER *et al.* deshalb die Aufrechterhaltung und Maximierung des Sauerstofftransportes der zentrale Ansatz der Therapie [22]. Da es jedoch auch zu Störungen der Sauerstoffverwertung kommt, kann dadurch die Gewebhypoxie nicht verhindert werden. Therapieziel sollte ein Anheben der O<sub>2</sub>-Aufnahme durch eine Erhöhung des O<sub>2</sub>-Transportes und ein Aufheben der Störung der O<sub>2</sub>-Verwertung sein. Also muss eine Optimierung des globalen O<sub>2</sub>-Transportes erreicht, ein Missverhältnis zwischen regionalem O<sub>2</sub>-Verbrauch und regionalem O<sub>2</sub>-Angebot verhindert und eine Aufrechterhaltung des Gas- und Substrataustausches auf Ebene der Mikrozirkulation geschaffen werden [53]. Als Beurteilungsmaßstab können dabei die Regression der Organfunktionsstörungen und der Laktatspiegel dienen.

### 1.3 STICKSTOFFMONOXID (NO)-METABOLISMUS

NO wird durch die NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert. L-Arginin ist dabei die Vorstufe für die Synthese verschiedener Produkte wie Harnstoff, Polyaminen, Kreatinphosphat oder NO. L-Arginin entsteht neben anderen Synthesewegen aus der Umsetzung von Citrullin durch die L-Argininsuccinat-Synthetase (AS) und die L-Argininsuccinat-Lyase (AL).



**Abbildung 1-1:** NO (Stickstoffmonoxid)-Bereitstellung in Abhängigkeit von der Enzymaktivität der Arginase, der NO-Synthase, der L-Argininsuccinat-Synthetase (AS) und der L-Argininsuccinat-Lyase (AL).

In Studien konnte gezeigt werden, dass diese beiden Enzyme in verschiedenen Zellen mit der iNOS coinduziert werden und somit die Bereitstellung von L-Arginin gewährleistet wird. Erstmals konnte die Coinduktion der iNOS und der AS in den RAW 264.7 Zellen von Mäusen nach Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) und Interferon ( $\text{IFN-}\gamma$ ) [9] und in kultivierten Pankreas- $\beta$ -Zellen von Ratten und Menschen gezeigt werden, welche mit Zytokinen behandelt wurden [152]. Die Coinduktion der iNOS und der AS zeigte sich außerdem *in vivo* bei Makrophagen von Ratten nach Zugabe von LPS [11]. Weiterhin konnte eine Coinduktion in aktivierten humanen Tumor-Zell-Linien [12] und in Gliom-Zellen von Ratten demonstriert werden.

Somit kommt es bei Vorliegen eines septischen Schocks zu Veränderungen der Konzentrationen der einzelnen Stoffwechselmetaboliten. LORTIE *et al.* beschäftigten sich mit der Frage, wie sich diese Konzentrationen der einzelnen Substrate bei Induktion eines septischen Schocks und bei gleichzeitiger Blockade der iNOS veränderten [12]. LPS reguliert die Synthese von Natrium ( $\text{Na}^+$ )-unabhängigen  $\text{Y}^+$ -Transportern hoch, was die Aufnahme von L-Arginin und Ornithin erleichtert [12,89,91,92]. Diese Steigerungen des L-Arginin-Transportes scheinen für die Bildung der dann folgenden hohen NO-Spiegel notwendig zu sein [129,130]. LORTIE *et al.* konnten eine *de-novo* iNOS-Expression in den Nieren der Versuchsratten 60 min nach LPS-Gabe nachweisen, mit einem Maximum zwischen 2-4 h [12]. Die Plasmakonzentrationen von L-Arginin fielen in den mit LPS-behandelten Tieren nach 30 min ab und sanken auch weiterhin im Versuchsverlauf, was das Konzept der gesteigerten L-Arginin-Aufnahme durch LPS stützt. In etwa synchron zeigte sich der Konzentrationsverlauf des Plasma-Ornithin-Spiegels. Gleichzeitig zeigten sich stark erhöhte Nitrat-Spiegel im Plasma, wahrscheinlich ausgelöst durch die massive NO-Produktion im Gewebe durch die iNOS. Dass neben der iNOS weitere Faktoren und Enzyme hochreguliert wurden, welche die NO-Produktion verstärken und/oder regulieren, zeigte sich durch die ansteigenden Konzentrationen von Spermidin und Putrescin im Plasma, Polyamine, welche als Ausgangssubstrat ebenfalls L-Arginin besitzen. Auf der anderen Seite gibt es mit der Arginase, von welcher zwei Isoformen existieren, ein Enzym, welches einer zu hohen NO-Produktion entgegenwirkt, indem es L-Arginin zu Ornithin und Harnstoff metabolisiert.

Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich eingehend mit dem L-Arginin- und somit dem NO-Metabolismus und hier besonders mit der Regulierung der Arginase-Isoformen in Bezug auf die iNOS in Makrophagen. Den beiden Isoformen, Arginase I und Arginase II, kommen durch die unterschiedlichen Aktivierungszeitpunkte und -wege verschiedene Funktionen zu. Die Arginase I ist ein zytosolisches, Leber-spezifisches Enzym, die Arginase II hingegen ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und nicht Leber-spezifisch. In verschiedenen Untersuchungen wurden unterschiedliche Coinduktionen der Arginase I und II mit der iNOS beschrieben. Hier konnte gezeigt werden, dass die Arginase II früh, die Arginase I hingegen viel später im Verlauf einer Endotoxinämie induziert wurden. Es wird spekuliert, dass die späte Induktion der Arginase I während der Endotoxinämie dazu dient, eine konstante NO-Überproduktion zu verhindern.

Auf der anderen Seite wird die Arginase II in der frühen Phase dieser induziert und stellt so Ornithin für die Polyamin- und/oder Prolin- und somit für die Kollagen-Synthese bereit. Da eine Überproduktion von NO toxisch auf Makrophagen und benachbarte Zellen wirkt, existiert somit ein Mechanismus, einer NO-Überproduktion entgegenzuwirken [11].

Mit Ng-Hydroxy-L-Arginin (NoHA), einem Zwischenprodukt der NO-Biosynthese, existiert wiederum ein kompetetiver Hemmer der Arginase I. In Untersuchungen zeigte sich, dass beträchtliche Mengen dieses Zwischenproduktes in den Medien LPS-behandelter Ratten in Alveolar-Makrophagen nachgewiesen werden können. Die Hemmung der Arginase I sollte die ausreichende Verfügbarkeit von L-Arginin für eine High-Output-Produktion von NO in den aktivierten Makrophagen sicherstellen. MORI *et al.* zeigten eine Aktivierung von RAW 264.7-Makrophagen bei Exposition dieser gegenüber LPS und IFN- $\gamma$  mit Induktion der iNOS und somit gesteigerter NO-Produktion [11]. Wurden Dexamethason und Dibutyryl-cAMP hinzugegeben, wurden die iNOS und die Arginase II induziert und die NO-Produktion fiel deutlich geringer aus. Dies bedeutet, dass die induzierte Arginase II die NO-Produktion durch Erschöpfung des intrazellulären L-Arginins herunterregulieren kann. Somit kommt L-Arginin als Substrat für die NO-Synthese eine wichtige Rolle zu und demonstriert die immense Entkoppelung der fein regulierten NO-Produktion bei Vorliegen eines septischen Schocks.

## 1.4 STICKSTOFFMONOXID (NO)-SYNTHASEN

NO ist als wichtiger Metabolit z.B. in die Vasoregulation, die Immunität und die Neurotransmission eingebunden. Synthetisiert wird es durch die NO-Synthasen, welche komplexe Enzyme darstellen.

Es wurden drei Isoformen der NO-Synthase identifiziert: Die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III), die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), und die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II). Die endotheliale und die neuronale NO-Synthase werden zur cNOS, der konstitutiven NO-Synthase, zusammengefasst, da sie konstitutiv vorhanden sind, wohingegen die iNOS durch verschiedene Stimuli induzierbar ist, wie zum Beispiel Zytokine oder bakterielle Lipopolysaccharide. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es bei der Induktion einer Sepsis zu einer vielfach gesteigerten Aktivität der iNOS kommt, wohingegen die Aktivität der cNOS abnimmt [4,37,38,90].

Wie bereits beschrieben, werden die NO-Synthasen einerseits in die konstitutiven NO-Synthasen (cNOS), welche die endotheliale und die neuronale NO-Synthase beinhalten, und andererseits in die induzierbare NO-Synthase (iNOS) unterteilt. Zwischen beiden Formen bestehen beträchtliche Unterschiede. Subzellulär unterscheiden sie sich bereits durch ihre Lokalisation. Die cNOS ist mit Zellmembranen assoziiert, wohingegen die iNOS ein zytosolisches Enzym darstellt. Ein weiterer Unterschied liegt darin, dass die Aktivität der cNOS von einem Calcium-Einstrom in die Zelle abhängig ist, wohingegen der intrazelluläre Calciumgehalt ruhender Zellen ausreicht, um die Aktivität der iNOS aufrechtzuerhalten [1]. KAMOSINSKA *et al.* arbeiteten in ihrer Studie mit A549-Zellen, welche viele Charakteristika von Alveolar-Epithelzellen vom Typ II besitzen [8]. Unter Kontrollbedingungen zeigten diese A549-Zellen ein Vorherrschen Kalzium-[Ca<sup>2+</sup>]-abhängiger NO-Synthase-Aktivität. Wurden sie jedoch mit den Zytokinen Interleukin [IL]-1-beta, Tumornekrosefaktoren (TNF) und Interferon (INF- $\gamma$ ) behandelt, kam es zu einem Anstieg der Ca<sup>2+</sup>-unabhängigen, nicht jedoch der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen NO-Synthase-Aktivität. Entsprechendes zeigten Western-Blot-Analysen. Hier zeigte sich eine Präsenz der eNOS- und keine iNOS-Aktivität unter Kontrollbedingungen. Inkubation der Zellen mit den genannten Zytokinen

für 12h veränderte eine Bereitstellung der eNOS nicht, führte aber zu einer starken Steigerung der Werte für das iNOS-Protein [8]. Daraus resultieren auch unterschiedliche Mengen produzierten NOs. Durch das Triggern der Aktivität der cNOS durch den Calcium-Einstrom ist die Aktivität nur vorübergehend und die Menge des NO ungleich geringer als die des durch die iNOS produzierten. Die Konzentrationen von gebildetem NO der cNOS liegen im picomolaren Bereich, wohingegen die iNOS im nanomolaren Bereich produziert. Auch ist die Aktivität der iNOS über Tage anhaltend.

Die cNOS spielt eine wichtige Rolle für die Blutdruckregulation durch Variation des Gefäßtonus und somit des Blutflusses und sorgt somit für eine adäquate Blutversorgung. Die iNOS hingegen wird durch verschiedene Zytokine sowie durch Vermittlung durch LPS induziert und dies nicht ausschließlich dort, wo NO zur Durchblutungsregulation benötigt wird, sondern diffus im Gefäßsystem, wodurch eine Fehlverteilung des Blutflusses entsteht. Eine Darstellung der physiologischen Rolle des Transmitters NO ist zum Verständnis seiner Bedeutung im septischen Geschehen unerlässlich. Seine Wirkung auf die Gefäße ist in Arterien ausgeprägter als in Venen sowie stärker in kleinen Gefäßen als in zuführenden. Die Freisetzung von NO in Gefäßen erfolgt Rezeptor-abhängig durch Acetylcholin, Bradykinin, Histamin, Serotonin und Adenosinnukleotide sowie durch Rezeptor-unabhängige Agonisten wie freie Fettsäuren [1]. Außerdem kann eine Stimulierung von Mechanorezeptoren von Endothelzellen zu einer Freisetzung von NO führen. Auch auf die Zellen des Blutes übt NO bedeutsame Wirkungen aus. Auf Thrombozyten wirkt NO reduzierend auf deren Aggregation, Adhäsion und Aktivierung. Thrombozyten selbst besitzen die Fähigkeit, NO zu produzieren und so einen eigenen negativen Feedback-Mechanismus auf ihre eigene Aktivierung bereitzustellen. Eine hemmende Wirkung übt NO des weiteren auf die Aggregation von Leukozyten und deren Freisetzung von Superoxid-Anionen aus. Somit moduliert NO Leukozyten-Gefäß-Interaktionen. Eine große Bedeutung wird NO weiterhin bei Entzündungsgeschehen und Infektionen zugeschrieben. Neutrophile, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und Kupffer-Zellen sind alle imstande, stimuliert durch verschiedene Wirkstoffe, Stickstoffmonoxid mit Hilfe der iNOS zu synthetisieren. In Folge der Induktion der

NO-Synthese durch die iNOS in den aktivierten Makrophagen kommt es zu einer nicht-spezifischen Zytotoxizität gegen Bakterien, Protozoen und Tumorzellen. Der Mechanismus, durch welchen das von den Makrophagen stammende NO seine zytotoxische Aktivität erzeugt, bleibt weiterhin unklar. KIRKEBØEN und STRAND diskutieren in einer Arbeit, dass die Produktion von Antioxidantien, wie Hydroxid (OH-) und Nitrit (NO<sup>2-</sup>), wichtig ist [1]. Darüber hinaus wird diskutiert, ob NO an Strukturen der mitochondrialen Atmungskette bindet und an der daraus resultierenden Zelltodreaktion beteiligt ist [56,103,106].

## **1.7 ROLLE DER KONSTITUTIVEN STICKSTOFFMONOXID-SYNTASE (cNOS) BEI DER SEPSIS**

Über die Rolle der konstitutiven NO-Synthase im Verlauf der Sepsis gibt es kontroverse Ansichten. SCOTT *et al.* beschreiben in einer Arbeit eine verminderte Aktivität der cNOS in der thorakalen Aorta septischer Ratten bei gesteigerter Aktivität der iNOS [4]. Die Autoren dieser Arbeit verwiesen auf weitere Arbeiten, in welchen die für die Induktion der iNOS wichtigen Zytokine gleichzeitig eine Instabilität der mRNA der cNOS bewirken [38].

Des weiteren wurde in einer Arbeit, in welcher die thorakale Aorta von Ratten für fünf Stunden mit Endotoxin inkubiert wurde, gezeigt, dass die resultierende Hemmung der cNOS-Aktivität durch eine reversible Hemmung der konstitutiven Isoformen durch die erhöhte Produktion von NO durch die iNOS bewirkt wurde [37]. Dies wird durch Ergebnisse gestützt, welche zeigen, dass die konstitutiven Isoenzyme empfänglicher für eine Selbsthemmung durch NO-Bindung im Häm-Eisen-Zentrum des Enzyms sind als die iNOS. BOYLE *et al.* hingegen sprechen der eNOS in einer ihrer Arbeiten keine Rolle bei der verminderten Ansprechbarkeit der Gefäße bei LPS-Behandlung zu, da diese in der Gruppen der iNOS-Knockout-Mäuse vollständig ausblieb [13]. In den von ihnen präparierten und als Versuchsobjekt verwendeten Mesenterialarterien von Mäusen zeigte Acetylcholin-Behandlung, welche eine eNOS-abhängige Vasodilatation ausübt, den gleichen Effekt sowohl bei LPS-behandelten- als auch bei Kontrolltieren. Sie schlussfolgerten daraus, dass LPS-Behandlung oder iNOS-Expression

die eNOS-Expression oder -Aktivität nicht verändern [13]. SZABO *et al.* jedoch schreiben in einer Arbeit gerade der cNOS eine große Verantwortung in der akuten Phase einer Endotoxinämie zu [42].

## 1.6 WIE WIRD DIE INDUZIERBARE STICKSTOFFMONOXID-SYNTASE (iNOS) HOCHREGULIERT?

Es ist bekannt, dass LPS oder entzündliche Zytokine wie zum Beispiel die Interleukine IL-1, IL-2, IL-6, TNF die iNOS-Genexpression antreiben. Dabei reicht die Stimulation durch IL-1 aus, aber um eine maximale iNOS-Induktion zu erreichen, benötigen humane Zellen im allgemeinen ein Zusammenspiel verschiedener Zytokine [8].

LPS und entzündliche Zytokine führen nicht nur zu einer Steigerung der mRNA-Spiegel der iNOS sondern auch der Cyclooxygenase-[COX]-2, wodurch ein Anstieg sowohl der Prostaglandine als auch von NO resultieren. HORI *et al.* diskutierten in ihrer Arbeit eine „Hochregulation der iNOS durch die COX-2“ [2]. Dass diese beiden Stoffwechselwege miteinander kommunizieren, belegte die Tatsache, dass die LPS-induzierte Freisetzung von Prostaglandinen bei Makrophagen durch den iNOS-Inhibitor Aminoguanidin gehemmt werden konnte [39]. Es wird weiterhin vermutet, dass die LPS-induzierte iNOS-Genexpression durch eine autokrine Regulation durch Prostaglandine durch Induktion der COX-2-Genexpression vermittelt sein könnte.

HORI *et al.* arbeiteten in ihrer Studie mit intestinalen Muskelsträngen von Ratten, wobei die iNOS- und COX-2-mRNAs in LPS-behandeltem Gewebe im Vergleich zum Kontrollgewebe stark exprimiert waren. Der mRNA-Spiegel der COX-2 begann 30 min nach LPS-Gabe zu steigen und erreichte nach 60 min ein Plateau. Die iNOS-mRNA hingegen begann nach 90 min anzusteigen und erreichte erst nach mehr als 4h einen Peak. Im Kontrollgewebe stiegen weder die mRNA der COX-2 noch der iNOS an. Weiterhin stellte sich heraus, dass LPS-Behandlung die Immunreaktivität von COX-1-Antikörpern weder in den *Muscularis*-ansässigen Makrophagen noch in glatten Muskelzellen änderte, also nur die COX-2 nicht jedoch die COX-1-Genexpression induziert wurde.



Auch in anderen Arbeiten wird über den Zusammenhang der iNOS- und der COX-2-Induktion berichtet. So berichteten PERKINS und KNISS in einer Arbeit mit von Mäusen stammenden Makrophagen, dass NO zum Erhalt erhöhter COX-2-Genexpression notwendig ist [39]. Gestützt wird diese These der Kommunikation zwischen iNOS und COX-2 des weiteren durch die von HORI *et al.* erreichte Wiederherstellung der durch LPS-induzierten hemmenden Einflüsse auf die Muskelkraft durch den selektiven COX-2-Hemmer NS-398 [2]. Weiterhin kam es in den LPS-behandelten Muskeln zu einer Freisetzung von Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin I<sub>2</sub>, wobei mit Hilfe immunhistochemischer Analysen gezeigt werden konnte, dass der Spiegel der COX-1-Protein-Expression sich nach LPS-Verabreichung nicht geändert hat, was den Schluss nahe legt, dass die erhöhte Produktion von PGE<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> der COX-2 nicht aber COX-1 zuzuschreiben sind.

## **1.7 DER TRANSKRIPTIONSFAKTOR NF-κB**

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, welche Einfluss auf die Genexpression ausüben [62]. Zu ihnen gehört der *Nuclear-Factor* kappa B (NF-κB), welcher zuerst von SEN und BALTIMORE identifiziert wurde [57]. Dieser Kernfaktor ist ein Transkriptionsfaktor, der als zentraler Mediator der Immunantwort und als Regulator verschiedener inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, Tumor-Nekrose-Faktor-α, aber auch der induzierbaren NO-Synthase wirkt und für deren maximale Expression bedeutend ist. In der Regel werden Zytokine nicht intrazellulär gespeichert, was ihre Sekretion von einer neuen Proteinsynthese abhängig macht. Als Konsequenz daraus wird die Bereitstellung von Zytokinen in Antwort auf inflammatorische Stimuli im Wesentlichen durch die Transkriptionsrate von Genen von Zytokinen reguliert. Des weiteren reguliert NF-κB Gene der Zell-Adhäsion, der Immunrezeptoren, hämatopoetischer Wachstums- und Rezeptorfaktoren [33]. Es gibt Anzeichen dafür, dass die Aktivierung von NF-κB in die Expression der iNOS und der COX-2 involviert ist. Unter anderem wird über übereinstimmende NF-κB-Bindungsregionen in den hochregulierenden Promotor-Regionen der iNOS- und COX-2-Gene berichtet [134,135]. XIE *et al.* zeigten in einer Arbeit, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors

NF- $\kappa$ B für die Induktion der induzierbaren NO-Synthase in durch Lipopolysaccharid aktivierten Makrophagen bei Mäusen notwendig ist [44].

Die Aktivierung und Regulation von NF- $\kappa$ B wird durch die Interaktion mit hemmenden Proteinen, I $\kappa$ B- $\alpha$ , I $\kappa$ B- $\beta$  oder I $\kappa$ B- $\varepsilon$ , streng kontrolliert, welche die Lokalisierung der inaktiven Form im Zytoplasma gewährleisten. Die Proteine binden dabei an NF- $\kappa$ B und verbergen dadurch das nukleare Lokalisierungssignal, was die nukleare Translokation von NF- $\kappa$ B verhindert [58]. Die Phosphorylierung der hemmenden Proteine triggert deren Ubiquitinierung, was zu einem darauffolgenden Abbau durch Proteasen führt und die Mobilisierung von NF- $\kappa$ B zum Zellkern und den Zugang zu regulierenden Genen erleichtert [58]. Der Prozess, welcher zur I- $\kappa$ B-Phosphorylierung führt, war Gegenstand einiger Studien. Es zeigte sich, dass I- $\kappa$ B durch einen Molekülkomplex aktiviert wird, der als I- $\kappa$ N-Kinase (IKK) bekannt ist [59,60]. Darüber hinaus wurde eine Kinase, die für die Aktivierung der IKK verantwortlich ist, entdeckt [61]. Dieses Protein, NIK (NF- $\kappa$ B inducing kinase), zeigt Homologie zu einigen MAP-Kinasen.

Freigesetztes NF- $\kappa$ B wandert zum Zellkern, wo es an spezifischen Promotorregionen bindet und die Gentranskription aktiviert. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B löst sowohl extra- als auch intrazelluläre Regulationsmechanismen aus, die in der Autoregulation der Inflammationskaskade durch Veränderung der NF- $\kappa$ B-Aktivität münden [62]. Wegen der großen Bedeutung als Regulator der Zytokin-vermittelten Entzündungsreaktion, ist die Aktivierung von NF- $\kappa$ B selbst ein behutsam kontrollierter Vorgang, der sowohl durch intra- als auch extrazelluläre Feedback-Mechanismen kontrolliert wird. Positives Feedback ereignet sich durch extrazelluläre Mechanismen, die der Verstärkung des Inflammations-Signals dienen. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B verstärkt die Transkription von TNF- $\alpha$  und IL-1. Beide Zytokine sind wiederum dafür bekannt, NF- $\kappa$ B zu aktivieren. Ein entzündliches Agens, wie zum Beispiel bakterielles Endotoxin, kann verursachen, dass Zellen NF- $\kappa$ B aktivieren, welches dann eine Aktivierung der TNF- $\alpha$ - und IL- $\beta$ -Produktion bewirkt und somit das eigentliche Entzündungszeichen verstärkt. Dieser Vorgang könnte sich beim Sepsis-Syndrom abspielen.

Eine negative Feedback-Kontrolle wiederum ist für die Regulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität essentiell. Sowohl intra- als auch extrazelluläre Mechanismen sind für die Limitierung der NF- $\kappa$ B-Aktivität auf einen Stimulus verantwortlich. Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt zu einer Hochregulation der Transkription der Gene I $\kappa$ B- $\alpha$  und p150, die beide für NF- $\kappa$ B verantwortliche Elemente besitzen [83,84]. Eine gesteigerte Produktion inhibitorischer Einheiten führt wahrscheinlich zu einem Zurückhalten von NF- $\kappa$ B im zytoplasmatischen Kompartiment und einem Herunterregulieren des aktivierten nuklearen NF- $\kappa$ B und somit zu einer Beendigung der Zytokintranskription und einer Limitierung der Entzündungsreaktion [85].

Zusätzlich zu den intrazellulären Feedback-Mechanismen gibt es extrazelluläre Mechanismen zur Limitierung der Entzündungsantwort durch die NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Inflammatorische Stimuli wie Endotoxin, TNF- $\alpha$  oder IL-1 können auch die Produktion entgegengesetzt wirkender Zytokine wie zum Beispiel IL-10 stimulieren, welche wiederum die Produktion proinflammatorischer Zytokine unterdrücken. WANG *et al.* zeigten, dass IL-10 in Monozyten die Zytokinproduktion durch Blockierung der Endotoxin-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmen kann [86]. Somit kann angenommen werden, dass es komplizierte Feedback-Mechanismen für die Kontrolle von NF- $\kappa$ B existieren, in die extrazelluläre Mechanismen involviert sind, die eine NF- $\kappa$ B-Aktivität sowohl stimulieren als auch hemmen können und intrazelluläre Feedback-Mechanismen, die die NF- $\kappa$ B-Aktivität durch einen Stimulus limitieren können.

CONNELLY *et al.* beschäftigten sich mit der Wirkung von NO auf die Aktivität von NF- $\kappa$ B [64]. Sie schrieben NO die Fähigkeit zu, die Expression einer Vielzahl proinflammatorischer Proteine einschließlich iNOS, COX-2 und IL-6 sowohl hoch- als auch herunter zu regulieren. Nach CONNELLY *et al.* übt NO auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität in Makrophagen von Mäusen einen biphasischen Effekt aus. Dieser biphasische Effekt von NO auf NF- $\kappa$ B hatte eine deutliche Wirkung auf das Aktivierungsprofil von Immunzellen und demzufolge einen wichtigen Stellenwert sowohl für die Induktion als auch die Hemmung der Entzündungsantwort. Der zweiseitige Effekt von NO auf NF- $\kappa$ B könnte außerdem teilweise die von vielen Autoren postulierte Fähigkeit von NO

erklären, pro- und anti-inflammatorische Einflüsse auszuüben [63]. CONNELLY et al. untersuchten, ob der Effekt der Hemmung der endogenen NO-Synthese auf die iNOS- und die COX-2-mRNA/Protein-Expression und die IL-6-Produktion das Resultat einer Modifikation des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sein könnte [64].

Unter Kontrollbedingungen resultierte aus einer Aktivierung von RAW 264.7-Zellen mit LPS ein Zeit-abhängiges Ansteigen der NF- $\kappa$ B-Aktivität mit einem Peak zwischen 1-2 h. In mit LPS stimulierten Makrophagen von Mäusen folgten auch die Expression der iNOS und COX-2 einem charakteristischen Muster. Dieses ist charakterisiert durch einen schnellen Anstieg bei 12 h gefolgt von einem Stillstand der Protein-Expression [65,66].

Diese Erkenntnisse von CONNELLY *et al.* stehen in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, die NO eine regulatorische Rolle bei der Genexpression zuschreiben und könnten teilweise erklären, warum in Studien einerseits berichtet wurde, dass NO die Expression proinflammatorischer Proteine wie iNOS [68,69], COX-2 [70], Zytokine [71,73,75] oder Adhäsionsmolekülen [76,77] sowohl hemmen kann als auch ihre Expression zu verstärken vermag (iNOS [78]; COX-2 [39,80], TNF- $\alpha$  [82]). Um nun den Zusammenhang der endogenen NO-Produktion und der NF- $\kappa$ B-Aktivität zu bearbeiten, erfolgte eine Hemmung der endogenen NO-Produktion 15 min vor LPS-Aktivierung mit Messung der NF- $\kappa$ B-Aktivität 90 min nach LPS-Gabe, wobei sich ein hemmender Effekt auf diese zeigte. Eine 9 h nach der Aktivierung erfolgte Hemmung der endogenen NO-Synthese wiederum führte zu einer deutlichen Verstärkung der NF- $\kappa$ B-Aktivität. Dieses Aktivitätsmuster deutet an, dass die Effekte von NO durch eine Modulation der NF- $\kappa$ B-Aktivität vermittelt werden. Um diese Möglichkeit weiter zu untersuchen, wurden die Effekte von exogenem NO auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität ermittelt. Auch hier erfolgte eine Erhärtung der Vermutung der biphasischen Natur der NO-vermittelten Modulation der NF- $\kappa$ B. Der NO-Donor DEA-NO übte einen Konzentrations-abhängigen Einfluss auf NF- $\kappa$ B aus, welcher eine Verstärkung der Aktivität bei Konzentrationen von 30 nM und 3  $\mu$ M gefolgt von einer Hemmung bei 30-300  $\mu$ M zeigte. Eine gleichzeitige Messung der mRNA- und der Protein-Spiegel der iNOS und COX-2 zeigten ebenfalls das beobachtete biphasische Muster der

DEA-NO-induzierten und NF- $\kappa$ B-vermittelten Veränderungen. Dies legt den Schluss nahe, dass sich die NO-vermittelte Änderung der NF- $\kappa$ B-Aktivität in einer signifikanten Änderung der Expression proinflammatorischer Proteine in diesen Zellen manifestierte. Insgesamt liefert die Arbeit von CONNELLY *et al.* Beweise dafür, dass eine Vielzahl von Proteinen, die über die Aktivität von NF- $\kappa$ B moduliert werden, durch NO in biphasischer Art beeinflusst werden.

MATSUMURA *et al.* beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Induktion der iNOS in glatten Gefäßmuskelzellen durch Lipopolysaccharid und der Rolle von NF- $\kappa$ B in diesem Prozess [137]. Des weiteren befassten sie sich in diesem Zusammenhang mit dem Mechanismus der Hemmung der iNOS durch Glukokortikoide. In ihren Untersuchungen konnten sie nachweisen, dass eine Gabe von LPS in Kombination mit Interferon- $\gamma$  (IFN) zu Zellkulturen glatter Gefäßmuskelzellen zu einer Induktion der iNOS-mRNA-Expression und der NO-Produktion führt. Die Zugabe von Dexamethason senkte die iNOS-mRNA-Spiegel und die NO-Produktion in den stimulierten Zellen signifikant. Ebenso zeigte sich eine deutliche Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch die LPS/IFN- $\gamma$ -Stimulierung mit einer Hemmung der Aktivität nach Dexamethason-Gabe in Dosis-abhängiger Weise. iNOS-Promotor-Funktionsanalysen haben gezeigt, dass sich diese Dexamethason-vermittelte iNOS-Hemmung auf dem Level der Transkription abspielt. Somit zeigten sie, dass die Dosis-abhängige Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität durch das Glukokortikoid Dexamethason der iNOS-Promotor-Aktivität in LPS/IFN- $\gamma$ -behandelten glatten Gefäßmuskelzellen entsprach. Dexamethason hemmte das Ansteigen der mRNA-Spiegel und der NO-Synthese in Proportion zu seiner Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivität und damit der iNOS-Promotor-Aktivität in LPS/IFN- $\gamma$ -stimulierten glatten Gefäßmuskelzellen. Einige weitere Autoren zeigten, dass Glukokortikoide in der Lage sind, die NF- $\kappa$ B-Aktivität zu hemmen, was als hauptsächlicher Mechanismus der anti-inflammatorischen Effekte der Glukokortikoide angesehen wird.

Außerdem belegen weitere Arbeiten, dass der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B für die LPS- und Zytokin-Induzierung der iNOS-Promotor bei Nagern benötigt wird [94,95]. Mittels *in vitro*-Studien konnte eine Protein-Protein-Interaktion zwischen

NF- $\kappa$ B und Glukokortikoidrezeptoren nachgewiesen werden, was ihre gegenseitige wechselseitige Hemmung der Transkriptions-Aktivität erklären könnte [96,98]. Weiterhin wurde eine Glukokortikoid-induzierte Transkription von I $\kappa$ B- $\alpha$  als Mechanismus der Glukokortikoid-vermittelten Immunsuppression gezeigt [99,100].

## 1.8 TOXISCHE EFFEKTE VON NO

NO übt sowohl zytoprotektive als auch zytotoxische Effekte aus. Die zytotoxische Aktivität von NO beinhaltet unter anderem die Produktion der hoch-reaktiven Substanz Peroxynitrat ( $\text{ONNO}^-$ ) [8]. Diese Substanz ist durch Reaktion mit verschiedenen Zielmolekülen, einschließlich Hydroxyl- und Sulfhydrylgruppen-enthaltenden Proteinen in der Lage, direkte Gewebeschäden zu verursachen.

KAMOSINSKA *et al.* zeigten, dass die  $\text{ONNO}^-$ -Spiegel in Zytokin-behandelten Zellen bedeutend höher waren als in Kontrollzellen. Peroxynitrit wirkte sich durch die Oxidation von Aminosäure-Resten negativ auf die Ionen-Kanal-Funktion aus [8]. Es zeigte sich in einigen Studien, dass es in der Lage ist, Ionen-Kanälen die Fähigkeit zu nehmen, auf reaktivierende Substanzen zu reagieren. Zum Beispiel hemmte die Oxidation von Sulfhydrylgruppen durch Peroxynitrit  $\text{Na}^+$ -Kanäle [109]. Des weiteren konnte in Studien eine Korrelation der myokardialen Dysfunktion und der Peroxynitrit-Konzentration gezeigt werden. In anderen Studien zeigte sich, dass Peroxynitrit, ebenso wie auch andere Oxidantien, in der Lage ist, den intrazellulären ATP-Spiegel zu erschöpfen. Diese Substanzen können zum Beispiel durch Hemmung der Glykolyse in die ATP-Produktion eingreifen [8]. Darüber hinaus ist NO in der Lage, Schlüsselenzyme im Zitratzyklus zu hemmen. Als einer der wichtigsten toxischen Effekte von NO wird die Störung der mitochondrialen Atmungskette angesehen. Es konkurriert mit dem Sauerstoff auf der Hämseite der Zytochromoxidase. Eine Reduzierung der NO-Produktion resultiert in einer Stimulation der oxidativen Phosphorylierung und einer gesteigerten peripheren  $\text{O}_2$ -Aufnahme.

## 1.8.1 ORGAN-DYSFUNKTIONEN

Im Zuge des septischen Schocks kommt es zu einer Beeinträchtigung multipler Organe. Dabei kommt es zunächst zu einer starken Hypotension ausgelöst durch Vasodilatation und Herzversagen, zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und zu einem verminderten Ansprechen auf konventionelle Vasopressoren wie Dopamin, Adrenalin oder Noradrenalin

### 1.8.1.1 Niere

Im Verlauf eines septischen Schocks kann ein Nierenversagens auftreten, was sich klinisch in einem Ansteigen des Plasma-Kreatinins manifestiert. Durch den verminderten arteriellen Systemdruck kann es zu einer direkten glomerulären Schädigung kommen. Die glomeruläre Permeabilität nimmt ab und es stellt sich eine Verminderung der glomerulären Filtrationsoberfläche ein. Weiterhin kann eine intratubuläre Obstruktion durch Tubuluszellpartikel auftreten. Klinisch wird eine Oligurie und Anurie und damit verbunden eine Retention harnpflichtiger Substanzen beobachtet.

### 1.8.1.2 Leber

Bei endotoxinämischen Ratten entwickelt sich eine signifikante Leberdysfunktion, erkennbar durch den Anstieg der Leber-Transaminasen. Ob NO zu diesen Veränderungen führt, wird gegenwärtig noch diskutiert. Auf der einen Seite sorgt NO durch seine vasodilatatorischen und antithrombotischen Eigenschaften für den Erhalt der Leberperfusion. Außerdem ist es in der Lage, Superoxid abzufangen. Auf der anderen Seite können exzessiv hohe NO-Werte die Bildung anderer freier Radikale verstärken und einige für den Lebenserhalt der Zelle unerlässliche Stoffwechselwege blockieren [3].

CURRAN *et al.* beschrieben einen Zusammenhang zwischen der NO-Produktion und der Hemmung der Proteinsynthese in der Leber *in vitro* [47], was einerseits einen schädlichen Einfluss von NO während der Sepsis nahe legt. Andererseits zeigte sich bei *in vivo*-Modellen bei Mäusen, dass eine L-NMMA-Behandlung bei LPS-induzierter Sepsis mit signifikanten Leberschäden assoziiert war, welche sich durch erhöhte Leber-Transaminasen manifestierten [48].

### 1.8.1.3 Myokard

Auch am Herzen kommt es Zytokin-vermittelt unter anderem zu einer verstärkten Bildung von durch die iNOS gebildetem NO. FERDINANDY *et al.* beschäftigten sich eingehend mit der Rolle von Peroxynitrit und dem myokardialen Versagen bei Induktion der iNOS durch Vermittlung proinflammatorischer Mediatoren am isolierten Herzen von Ratten [20]. Sie zeigten auf, dass proinflammatorische Zytokine auch zu einer gesteigerten Aktivität der iNOS im Myokard führen und die daraus resultierende verstärkte Bildung von NO einen großen Anteil an der eingeschränkten mechanischen kardialen Funktion trägt. LNA, N-nitro-L-Arginin, ein NOS-Inhibitor, konnte den Zytokin-vermittelten Verlust myokardialer Funktionsfähigkeit teilweise wieder herstellen. Als außerordentlich wichtig stellte sich dabei die Bildung von Peroxynitrit aus der Reaktion von NO mit Superoxid heraus. Dies aus der Beobachtung, dass FeTPPS, ein Katalysator des Peroxynitrit-Zerfalls, ein Aufheben des Verlusts der kardialen Funktionsfähigkeit einhergehend mit einem Absinken der Peroxynitrit-Konzentration im Perfusat erreichte. Des weiteren zeigten sie eine signifikante Korrelation zwischen myokardialer Funktion und Peroxynitrit-Konzentration auf.

Insgesamt haben *in vitro* Studien sowohl positive als auch negative Effekte der NOS-Hemmung auf die Herzfunktion gezeigt. In verschiedenen Studien konnte in Kardiomyozyten, isolierten Papillarmuskeln und bei Herzpräparaten eine verminderte Kontraktilität nachgewiesen werden. Ein Anstieg der iNOS-mRNA in der Wand des linken Ventrikels bei Endotoxin-behandelten Ratten war nach 30 min zu verzeichnen, wobei sich ein Peak nach 3h zeigte [49]. Der dazugehörige Anstieg der NO-Werte in isolierten Kardiomyozyten bei Ratten zeigte sich bei BALLIGAND *et al.* [50] nach 3h, mit einem Peak nach 6h. Eine unselektive NOS-Hemmung stellte sich durch seine Effekte auf die Koronar-Gefäße als kritisch dar. Andere Ergebnisse lieferten die Arbeiten von GRANDEL *et al.* [23]. Diese arbeiteten mit isolierten Herzen von Ratten, welche mit dem alpha-Toxin von *Staph. aureus* perfundiert wurden und stellten dabei eine Hochregulation der cNOS, nicht jedoch der iNOS fest. Untermuert wurden die Ergebnisse durch ein Ansteigen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ Spiegels, dem wichtigsten Mechanismus der  $\text{Ca}^{2+}$ abhängigen cNOS. Daneben konnte die Toxin-induzierte Freisetzung von NO durch den



selektiven iNOS-Inhibitor PBITU nicht gehemmt werden, sehr wohl jedoch durch den nicht-selektiven NOS-Inhibitor L-NMMA. Mit Hilfe immunhistochemischer Techniken gelang es, einen deutlichen Anstieg der Expression der cNOS nachzuweisen, nicht jedoch der iNOS.

Der Anstieg der NO-Synthese unter den Bedingungen der alpha-Toxin-Perfusion wurde dabei als Mechanismus verstanden, welcher die vasokonstriktorische Antwort der Koronargefäße auf bakterielle Agenzien abschwächen soll. Im Einklang damit steht die Beobachtung, dass die Toxin-induzierte NO-Synthese in Anwesenheit von L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, gesteigert war und der gesteigerte koronare Perfusionsdruck abgesenkt werden konnte [23]. Neben dem direkten Einfluss von NO auf die Koronarien, vermuteten GRANDEL *et al.* auch eine positive Beeinflussung der Kontraktilität des Myokards durch NO. Dies, weil die Hemmung der NO-Synthase durch L-NMMA sowohl die koronare Vasokonstriktion als auch die Hemmung der Kontraktilität unter dem Einfluss des Toxins verstärkte. Eine weitere interessante Erkenntnis lieferte die Arbeit mit Zaprinast, einem spezifischen Phosphodiesterase-5-Inhibitor, welches den Abbau von cGMP, dem intrazellulären second messenger von NO, katalysiert. Sowohl die NO-vermittelte Vasodilatation als auch die Veränderungen der myokardialen Leistungsfähigkeit werden der cGMP-Bildung, resultierend aus der cNOS-Aktivierung, zugeschrieben. Im Experiment konnte Zaprinast die koronare Vasokonstriktion bei alpha-Toxin-Perfusion deutlich abschwächen, was die These, dass die vasodilatatorischen Effekte der NO-Bildung über ansteigende cGMP-Spiegel vermittelt werden, unterstützt. Ebenso zeigte sich eine Abschwächung der Hemmung der Kontraktilität unter Zaprinast. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Vermutungen, dass die durch die koronare Vasokonstriktion verursachte Mangelversorgung der regionalen Perfusion bei Toxin-Exposition der Hauptgrund für die myokardiale Depression ist und die Toxin-vermittelte NO-Freisetzung den Verlust der Kontraktilität teilweise wieder aufhebt, indem es der Vasokonstriktion entgegenwirkt [23]. Ähnliches zeigt die Arbeit von AVONTUUR *et al.*, welche postuliert, dass eine fokale Ischämie und ein Verlust der Kontraktilität im isolierten Herzen endotoxinämischer Ratten bei Blockade der NO-Synthase resultiert [110].

#### 1.8.1.4 Septischer Darm

Gerade der Intestinal-Trakt ist im besonderen Maße in das septische Geschehen involviert. Um die Vorgänge, die sich bei der Sepsis, aber auch bei Traumen, Entzündungen oder Insulten dort abspielen, verstehen zu können, muß man den besonderen anatomischen Gegebenheiten Rechnung tragen.

Zunächst ist es die einzigartige Gefäßanatomie der intestinalen Villi mit dem gegenströmenden Sauerstoffaustausch, der die Mucosa gegenüber einer Hypoxie sehr empfindlich macht [24]. Auch ist die normale Blutverteilung in der Wand des Darmes nicht homogen. Der mittlere mucosale Blutfluß ist zwei bis vier Mal größer als der Blutfluß in der *Muscularis*. Dies, um den hohen Sauerstoffbedarf der Mucosa zu decken. Außerdem stellt die intakte Mucosa eine Barriere dar, welche eine Translokation von Bakterien und bakteriellen Toxinen in die systemische Zirkulation verhindert [26].

Es wurde gezeigt, dass Endotoxin die intestinale Permeabilität sogar bei gesunden Probanden steigert, was zeigt, dass Endotoxin selbst die weitere Translokation von Bakterien und Endotoxin induziert und so zum Erhalt der Sepsis und des septischen Schocks in einem Sich-selbst-erhaltenden-Prozeß führt. Eine gesteigerte mucosale Permeabilität stellt dabei ein frühes Zeichen einer Schädigung der intestinalen Mucosa dar [26].

In experimentellen Studien wurde eine durch LPS induzierte Hemmung der glatten Muskulatur im Darm von Ratten nachgewiesen. Mit der Wirkung einer experimentellen Endotoxinämie auf die intestinale villöse Mikrozirkulation beschäftigten sich unter anderem SCHMIDT *et al.* [26]. Versuchsratten, bei welchen durch eine intraperitoneale LPS-Bolus-Injektion eine Endotoxinämie induziert wurde, zeigten trotz adäquater Volumenzufuhr intestinale mucosale Schädigungen mit Gewebhypoxie und gesteigerter Laktatproduktion. Die Autoren dieser Studie vermuten, dass in der intestinalen Mikrozirkulation regulatorische Reaktionen existieren, welche die mucosale Perfusion trotz gesteigerter Blutzufuhr zu den Organen reduzieren.

SPAIN *et al.* beobachteten in einer Arbeit innerhalb einer Stunde nach Induktion einer Bakteriämie eine Verschlechterung der intestinalen mikrovaskulären Durchblutung [25]. Verursacht wurde dies sowohl durch eine Konstriktion der

großen zuführenden als auch der kleinen prä-mucosalen Arteriolen. Aus der Vasokonstriktion resultierte ein reduzierter mikrovaskulärer Blutfluss und eine mucosale Hypoperfusion.

In dem Endotoxinmodell von SCHMIDT *et al.* konstringierten die zentralen villösen Arteriolen um 17 % und der mucosale Blutfluß nahm, trotz Erhalt des mittleren arteriellen Blutdruckes, um 30 % ab [26]. Die in dieser Studie beobachtete Reduktion des Blutflusses in den Villi steht in Übereinstimmung mit der Erkenntnis, dass die frühen histologischen Veränderungen der intestinalen ischämischen Schädigungen in Form fleckförmiger Nekrosen der oberflächlichen Epithelschichten an der Spitze der Villi lokalisiert sind. Diese Ergebnisse stimmen weiterhin mit Beobachtungen VALLETS *et al.* überein, welche eine deutliche Rückverteilung innerhalb der Organwände, weg von der Mucosa hin zur *Muscularis*, während der Sepsis beschrieben [111]. Die Reduktion der Perfusion der Villi ist dabei von einer Abnahme des Durchmessers der Hauptarteriole begleitet. Auch andere Gruppen, welche mit Modellen einer normotensiven Sepsis induziert durch lebende *Escherichia coli* arbeiteten, beschreiben einen Rückgang der segmentalen Durchblutung, gemessen in den mesenterialen Arkaden-Arterien [51,52]. In diesen Studien war die Reduktion der segmentalen Durchblutung von einer durchgehenden Abnahme der Durchmesser der Gefäße von den zuführenden bis zu den submucosalen Arteriolen der Organwand begleitet. Auch FARQUHAR *et al.* berichteten über eine reduzierte Kapillar-Perfusion der intestinalen Mucosa infolge caecaler Ligatur und Punktion, trotz adäquater Volumenzufuhr [24]. Diskutiert wurde dabei, ob diese Veränderungen auf einer gehemmten Zellfunktion, einer verstärkten Produktion von Vasokonstriktoren oder einer Kombination von beidem beruhen. Anhand von Messungen konnte in den bakteriämischen Ratten keine Veränderung der Antwort auf topische ACh-Applikation sowohl der zuführenden als auch der prä-mucosalen Arteriolen nachgewiesen werden. Die Vasokonstriktion auf Noradrenalin-Gabe hingegen war in den prä-mucosalen Arteriolen deutlich verschlechtert. In diesem Zusammenhang wird ein unterschiedliches Ansprechen der zuführenden und der prä-mucosalen Arteriolen auf die Bakteriämie vermutet.

Mit dem histologischen Korrelat der Endotoxin-Wirkung auf die Mucosa beschäftigten sich CROUSER *et al.* [27]. In ihrer Arbeit verabreichten sie Katzen LPS intravenös. Zwei Stunden nach Verabreichung zeigten sich epitheliale Nekrosen und damit einhergehende zelluläre und mitochondriale Schädigungen im Epithel des Ileum trotz unveränderter Werte der ilealen Sauerstoffgewebekonzentrationen, des Blutvolumens und des Blutflusses. Die Autoren vermuteten, dass die Schädigungen eher aus Nekrosen als aus Apoptosen resultierten. Es zeigten sich Rundungen der Zellkerne mit einem Fehlen der Kernchromatin-Kondensation. Des weiteren starke Schwellungen der Mitochondrien mit Spaltung der Membran-Integrität. Obwohl die Schädigung der Mitochondrien von milden zu schwerwiegenden Formen bei den LPS-behandelten Tieren variierte, war die LPS-Behandlung im Durchschnitt mit einer signifikanten Schwellung aller mitochondrialer Räume, im besonderen der Cristae, assoziiert. Die beobachteten frühen zellulären und subzellulären Veränderungen stimmten mit Zellnekrosen überein und traten ohne signifikante Veränderungen der ilealen Durchblutung oder Sauerstoffverfügbarkeit im Gewebe auf. Innerhalb der ersten vier Stunden nach LPS-Behandlung zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Apoptosen. Im Gegensatz dazu stellten sich die Epithelzellen und Mitochondrien bei den Kontrolltieren als normal dar. Vier Stunden nach Behandlung wurde in den Spitzen der Villi ein signifikanter Anstieg der Kernchromatin-Fleckung beobachtet. Der Apoptose-Index stieg auf annähernd das fünffache des Ausgangswertes an, wohingegen bei den Kontrolltieren nur kleine Veränderungen beobachtet werden konnten. Mit Hilfe immunhistochemischer Methoden konnte im ilealen Gewebe ein signifikanter Anstieg des Vorkommens der induzierbaren NO-Synthase gezeigt werden. Diese Bedingungen waren in den Spitzenregionen der Villi vorherrschend und primär auf die Epithelzellen beschränkt [27].

Weiterhin kommt es während der Sepsis und dem Multiorganversagen häufig zu einer gastrointestinalen Dysmotilität. Gegenwärtige Daten unterstützen die Hypothese, dass bakterielle Toxine, im besonderen Endotoxin und Zytokine, primär im Darmkanal gebildet, als verursachende Faktoren eines Sepsis-induzierten Ileus fungieren. Weiterhin wurde festgestellt, dass Endotoxin eine Leukozyten-Infiltration innerhalb der *Muscularis* verursacht und eine profunde

Reduktion der mechanischen Aktivität der intestinalen glatten Muskulatur bewirkt. In diesem Zusammenhang zeigen sich aktivierte Makrophagen als bemerkenswert wandelbare Zellen, welche über einhundert verschiedene Substanzen im Übermaß, einschließlich Prostaglandinen, Leukotrienen und NO, sezernieren können. Viele dieser Faktoren sind bekannt, die kinetischen Eigenschaften der gastrointestinalen glatten Muskulatur direkt zu verändern und sind potentielle Vermittler des intestinalen Ileus.

ESKANDARI *et al.* verzeichneten in einer Arbeit nach intraperitonealer LPS-Bolus-Injektion eine gesteigerte Expression der iNOS mRNA mit einem Peak nach 3 Stunden [29]. Der Großteil des iNOS-Proteins schien im Netzwerk der in der Muscularis lokalisierten Makrophagen vorhanden zu sein. LPS-Injektion und die daraus resultierende Hochregulation der iNOS wurde von einer deutlichen Abnahme der spontanen Kontraktilität der glatten Muskulatur gefolgt. Die zirkuläre Muskulatur LPS-behandelter Wild-Typ-Mäuse zeigte eine signifikante Hemmung der spontanen Muskelaktivität um 57 %. Um den großen Stellenwert der iNOS in diesem Prozess zu demonstrieren, zeigten ESKANDARI *et al.* einerseits eine Verbesserung der durch die LPS-induzierten Verschlechterung der Aktivität der zirkulären glatten Muskulatur durch die selektive iNOS-Hemmung durch L-NIL um 44%. Andererseits zeigte sich durch alleinige L-NIL-Behandlung von jejunalen Muskelfasern der Maus unbehandelter Kontrolltiere oder unbehandelter iNOS-Knockout-Mäusen keine Zunahme der Aktivität der glatten zirkulären Muskulatur. Bei Behandlung der iNOS-Knockout-Tiere mit LPS war die spontane Aktivität der Muskelfasern erheblich geringer eingeschränkt als in den Wild-Typ-Mäusen und L-NIL änderte die spontane Aktivität nicht.

## **1.9 LPS UND GLATTE MUSKULATUR**

Eine weitere Konsequenz der Verabreichung von LPS mit daraus resultierender Induktion der iNOS und erhöhten NO-Werten, ist die verminderte Kontraktionsfähigkeit glatter Muskelzellen besonders der arteriellen Gefäße. Dort kommt es typischerweise zu einer verminderten Ansprechbarkeit auf konventionelle Vasopressoren.

Mit der Frage, inwiefern die iNOS für diese LPS-vermittelten Effekte verantwortlich ist, beschäftigte sich eine Arbeit von *Boyle et al.*[13]. Dort arbeiteten sie einerseits mit Mesenterial-Arterien von Wild-Typ- andererseits von iNOS-Knockout-Mäusen. LPS-Applikation führte in den Gefäßen der Wild-Typ-Mäuse zu einer deutlichen Reduktion der Noradrenalin-induzierten Kontraktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe, welcher die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung verabreicht wurde. Diese Reduktion der Noradrenalin-vermittelten Kontraktionskraft konnte durch Behandlung mit dem relativ spezifischen iNOS-Inhibitor Aminoguanidin wieder hergestellt werden.

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der iNOS-Knockout-Mäuse mit LPS zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der Noradrenalin-induzierten Kontraktion in den Gefäßen. Verabreichung von Aminoguanidin führte in dieser Versuchsgruppe weiterhin zu keiner gesteigerten Noradrenalin-induzierten Kontraktion.

Gab es bisher Versuchsmodelle der Sepsis, in welchen durch nicht-selektive oder selektive NO-Synthase-Inhibition nur ein kleiner, keiner oder sogar ein nachteiliger Effekt erzielt wurde, gibt die Arbeit eindeutige Anhalte für die Verantwortlichkeit der iNOS für die verminderte Ansprechbarkeit der Gefäße nach LPS-Gabe. Die Beobachtung, dass Aminoguanidin die Noradrenalin-induzierte Kontraktion nach LPS-Behandlung nicht wieder voll herstellen konnte, wohingegen das Fehlen des iNOS-Gens dies konnte, deutet darauf hin, dass die iNOS-Expression eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Effekte von LPS auf die Ansprechbarkeit der Mikrozirkulation auf Vasokonstriktoren spielt.

## 1.10 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Bei der Behandlung der septischen Krankheitsbilder fehlt gegenwärtig ein adäquates Therapiekonzept, welches sowohl den Erhalt der makrozirkulatorischen Verhältnisse der Patienten gewährleistet ohne dabei zu einer Verschlechterung der mikrozirkulatorischen Durchblutung zu führen und somit eine Verschlechterung des Krankheitsgeschehens zu bedingen.

Um neue Erkenntnisse in dieser Richtung zu erlangen, sollte bei der vorliegenden Arbeit ein Modell des septischen Schocks der Ratte entwickelt werden, welches es ermöglicht, gegenwärtige Therapieformen miteinander zu vergleichen und gleichzeitig neue Therapieansätze in Bezug zu diesen setzen zu können. Dabei sollten die Verläufe sowohl der makrozirkulatorischen als auch der mikrozirkulatorischen Verhältnisse unter Kontrollbedingungen, ohne Therapie und unter den verschiedenen Therapiekonzepten *in vivo* aufgezeichnet und ein Vergleich ermöglicht werden. Erstes Ziel war die Induktion des septischen Schocks in einem Ganztiermodell durch intravenöse Injektion des Lipopolysaccharids von *Salmonella Arbotus Equii*. In diesem Modell sollten anschließend etablierte Therapieverfahren des septischen Schocks, wie Volumensubstitution oder Katecholamininfusion, die der Stabilisierung des Blutdruckes dienen, mit einem neuen Therapieverfahren verglichen werden. Dies umfasste die Hemmung der NO-Synthasen, welche eine herausragende Rolle im septischen Schock spielen, mit verschiedenen Hemmstoffen. Unter Berücksichtigung des arteriellen Blutdruckes (Makrozirkulation) sollte ein Fokus dieser Arbeit auf Störungen der mucosalen Hämoglobinoxygenierung (Mikrozirkulation) gelegt werden, welche mittels spektrophotometrischer Techniken quantifiziert werden sollten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wertigkeit der verschiedenen Therapieformen miteinander vergleichen zu können und gleichzeitig neue Therapieansätze aufzuzeigen. Abschließend sollte eine Beurteilung über die Wertigkeit der einzelnen Therapien unter Beachtung der relevanten Gesichtspunkte möglich sein.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 BESCHREIBUNG DES VERWENDETEN GANZTIERMODELLS

Bei dem verwendeten Ganztiermodell der Ratte handelt es sich um ein seit 1998 in der Arbeitsgruppe SEEGER *et al.* angewandtes Modell. Die Verwendung eines Ganztiermodells ermöglicht es, pathophysiologische Zusammenhänge *in vivo* am Ganztier experimentell zu demonstrieren und verschiedene Parameter zu registrieren. Gleichzeitige Messungen an unterschiedlichen Organsystemen sind möglich.

So erlaubt der *in vivo* Versuchsmodus die kontinuierliche Messerfassung biophysikalischer Parameter wie zum Beispiel dem systemisch arteriellen Druck, dem rechtsventrikulären Druck, dem zentralvenösen Druck, dem Beatmungsdruck oder aber auch die gleichzeitige Aufzeichnung der Mikrozirkulationsverhältnisse der Darmmucosa. Dies stellt gerade in der hier zu bearbeitenden Problemstellung die große Bedeutung des Ganztiermodells mit *in vivo* Messung dar, da Auswirkungen und Zusammenhänge verschiedener Organsysteme hiermit darstellbar werden und Organsysteme nicht isoliert betrachtet werden sollten.

#### 2.1.1 VERSUCHSTIERE

Für die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche Ratten (CD-Ratten) der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 300 und 450g verwendet.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in bereits bestehenden Tierstallungen. Die Pflege der Tiere wurde von angestellten, examinierten Tierpflegern der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Eine tierschutzgerechte Vorgehensweise war somit gewährleistet und wurde durch die Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen mit dem Aktenzeichen II 25.3-19c 20/15 (1)-51/98 gestattet.



### 2.1.2 PRÄPARATION

#### - Erster Versuchsschritt

Im ersten Versuchsschritt, der Injektion des Lipopolysaccharids oder aber in den Kontrollgruppen der physiologischen Kochsalzlösung, wurden die Tiere mit einer Dosis von 1 ml Fentanyl, entsprechend 0,125 mg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG), und einer Dosis von 100 µl Domitor, entsprechend 0,25 mg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG), intraperitoneal, anästhesiert. Nach einer Einwirkdauer von 15 Minuten und einer Kontrolle der Anästhesie durch Prüfung der Zwischenzehenreflexe, wurde mit der Präparation begonnen.

Um eine weitere Gewährleistung schmerzfreier Präparationen zu sichern, wurde im Bereich oberhalb der linken *Vena jugularis interna* mit 2 % Xylocain eine Quaddel gesetzt. Mit einem Skalpell wurde ein etwa 1 cm langer Schnitt gesetzt und unter schichtweiser Präparation die linke *Vena jugularis interna* dargestellt. Unter Zuhilfenahme einer Pinzette wurde diese dann mit 2 Fäden umschlungen und kranialwärts unterbunden. Nach Schaffung eines venösen Zugangs durch Kanülierung der Vene unter strenger Beachtung der Vermeidung einer Embolie, wurde das Lipopolysaccharid der Gattung *Salmonella abortus* gelöst in 0,9 %iger Kochsalz-Lösung intravenös verabreicht. Anschließend wurde unter gleichzeitiger Entfernung des Zugangs auch der kaudalwärts gerichtete Anteil der *Vena Jugularis interna* unterbunden, das Präparations-Gebiet mit 2% Xylocain gequaddelt und die Wundstelle vernäht.

Zur Aufhebung der Narkose während der Inkubationszeit wurde zur Antagonisierung der Wirkung des Fentanyls und des Domitors Naloxon und Antisedan in einer Dosierung von 0,05 bzw 0,125 mg pro Kilogramm Körpergewicht intraperitoneal und Naloxon zusätzlich in einer Dosierung von 0,05 mg pro Kilogramm Körpergewicht subcutan verabreicht.

#### - Zweiter Versuchsschritt

Nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden erfolgte die zweite Versuchsphase. Die Versuchstiere wurden mit Pentobarbital-Natrium in einer Dosierung von 40 mg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG) *intraperitoneal* anästhesiert. Nach einer Einwirkzeit von 10-15 Minuten wurde zur Kontrolle der Anästhesie der Zwischenzehenreflex geprüft. Zur weiteren Schmerzausschaltung wurde im Halsbereich großzügig eine

Hautquaddel mit 2% Xylocain gesetzt. Durch schichtweise Präparation unter Schonung anliegender Gefäße wurde die Trachea zur Darstellung gebracht und mit einer offenen Ligatur unterbunden. Nach Eröffnen der Trachea durch Inzision zwischen zwei Trachealknorpel und Einbringen eines Endotrachealtubus begann die kontrollierte Beatmung mit einem Gemisch aus 50 % Sauerstoff und 50% Stickstoff bei einem Atemzugvolumen von 3 ml, einer Atemfrequenz von 60/min und einem positiv endexpiratorischen Druck von 1 cm Wassersäule. Zur weiteren Narkotisierung erhielten die Tiere intraperitoneal Ketaminhydrochlorid.

Im nächsten Schritt wurde durch vorsichtige Präparation zunächst die rechtsseitige *Vena jugularis interna* dargestellt und mit zwei Fäden umschlungen. Anschließend wurde unter Schonung des anliegenden *Nervus vagus* die linke *Arteria carotis communis* freigelegt und ebenfalls mit zwei Fäden umschlungen. Nach Abbinden der rechtsseitigen *Vena jugularis interna* durch einen der beiden Fäden erfolgte das Einlegen einer Schleuse, einerseits zur Schaffung eines venösen Zugangs, andererseits als Zugangsweg für die rechtsventrikuläre Druckmessung. Unmittelbar nach Fixierung der Schleuse durch den verbleibenden Faden erfolgte, zur Antikoagulation, eine intravenöse Heparinisierung über den venösen Zugang. Nach Unterbinden der linken *Arteria carotis communis* kranialwärts wurde ein Druckaufnehmer über einen Guide eingelegt, dieser mit einem Faden fixiert und mit der Druckaufzeichnung des systemisch arteriellen Druckes über den Druckaufnehmer begonnen.

Anschließend wurde unter Kontrolle des systemisch arteriellen Druckes ein PE50-Katheter über die Schleuse zur rechtsventrikulären Druckaufzeichnung in den rechten Ventrikel eingeführt. Über diesen erfolgte eine kontinuierliche Erfassung der rechtsventrikulären Druckverhältnisse. Zur Erfassung der aus dem Blut zu bestimmenden Parameter wurden nun sowohl ein venöser als auch ein arterieller Astrup abgenommen.

Um eine vollständig kontrollierte Beatmung zu gewährleisten, wurde das Versuchstier durch eine Pancuronium-Infusion über einen Perfusor über die Schleuse relaxiert. Dies mit einem Pancuronium/NaCl-Gemisch [1:4], in einer Dosierung von 1 ml/h, entsprechend 0,1 mg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG).

Im Anschluss daran wurde unter vorigem Setzen einer Quaddel mit 2 % Xylocain ein Hautschnitt im rechten Quadranten des Unterbauches mit einem Skalpell durchgeführt. Zur Schaffung eines transabdominellen Zugangs mussten dann die entsprechenden Muskelschichten mit einem Skalpell durchtrennt werden, um im Folgenden durch das Peritoneum zur Bauchhöhle zu gelangen. Nach Setzen einer Inzision eines Dünndarm-Abschnitts von etwa 3-4 mm Länge wurde um diesen Bereich eine Tabaksbeutel-Naht gelegt und die Mess-Sonde des Empho II eingeführt und durch Zuziehen der Naht fixiert. Im Anschluss an diese Schritte, begann die Aufzeichnung der Hämoglobinoxygenierung der relativen Hämoglobinkonzentration in der Dünndarm-Mucosa.

Die gesamte Präparation wurde in einem Zeitraum von maximal 30 Minuten durchgeführt. Dies unter kontinuierlicher kontrollierter Beatmung und sterilen Bedingungen. Somit erfolgten die nachkommenden Therapieinterventionen unter Aufzeichnung des systemischen arteriellen und des rechtsventrikulären Blutdrucks, des Beatmungsdruckes, der Perfusion der Dünndarmmucosa sowie der über Blutentnahme durch ein Blutgasanalysegerät bestimmten Blutparameter ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ , pH-Wert, Sauerstoffsättigung, Hydrogencarbonat ( $HCO_3^-$ ), Base-Excess, Plasma-Nitrat und -Laktat) sowohl arteriell als auch venös.

Nach Beendigung der Präparation erfolgten, je nach Zugehörigkeit zu verschiedenen Therapiegruppen, unterschiedliche Therapie-Interventionen. Diese setzten 5 Minuten nach Beginn der kontinuierlichen Datenerfassung ein. Über den kompletten Versuchszeitraum erfolgten halbstündige arterielle und venöse Blutentnahmen über die eingebrachten Druckaufnahme-Katheter.

## **2.2 ANSETZEN DES LIPOPOLYSACCHARIDS**

Zur Induktion des septischen Schocks wurde den Versuchstieren Lipopolysaccharid der Bakteriengattung *Salmonella abortus* intravenös injiziert. Dieses wurde in 0,9 %iger Kochsalzlösung in einer Dosierung von 10 mg Lipopolysaccharid pro Milliliter angesetzt und anschließend bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.3 BLUTENTNAHME

Die Blutentnahmen wurden mit einer 1 ml Spritze durchgeführt. Ein Blutvolumen von circa 100 µl sowohl arteriellen als auch venösen Blutes wurde benötigt. Nach Entnahme des Blutes wurde eine Durchspülung der Katheter mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt, einerseits zur Ersetzung des entnommenen Blutvolumens, andererseits zur Sicherstellung der weiterhin korrekten Druckaufnahme.

Unmittelbar nach Gewinnung des Blutes wurde dieses in ein Blutgasanalysegerät aufgegeben und folgende Parameter bestimmt:  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , Sauerstoffsättigung, pH-Wert, Base Excess,  $HCO_3^-$ , Hämoglobin (Hb). Das zum Erhalt des Laktat- und des Nitrat-Gehaltes entnommene Blut wurde mit den Substanzen Trasylol® und Pentoxifyllin® versetzt und anschließend zentrifugiert. Zur Gewinnung des Plasmas wurde der Überstand abpipettiert und der Rest verworfen. Das Plasma wurde dann vor Analyse der Werte bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.4 MESSWERTREGISTRIERUNG

Nach Kanülierung der linken *Arteria carotis communis* und Einlegen einer Schleuse in die rechte *Vena jugularis interna* mit anschließender Rechtsherzkatheterisierung bis in den rechten Ventrikel, erfolgte eine kontinuierliche Registrierung des systemisch arteriellen sowie des rechtsventrikulären Druckes.

Das Prinzip der Erfassung der Druckwerte beruhte auf der Erzeugung einer stehenden Wassersäule auf Herzniveau. Diese wurde durch die mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten in den Gefäßen liegenden Katheter erzeugt. Die Katheter waren mit Drei-Wege-Hähnen verbunden, welche die Überleitung zu mit destilliertem Wasser gefüllten Schläuchen darstellten. Über diese Schläuche wurde anschließend die Druckwelle zu einer Wandlerkarte weitergeleitet, welche die Impulse verarbeitete und graphisch auf einen Computer darstellbar machte. Somit konnte während der gesamten Versuchsdauer eine kontinuierliche Messwertregistrierung sowie Messwertspeicherung erfolgen. Vor Versuchsbeginn erfolgte jeweils eine Eichung des Messsystems.

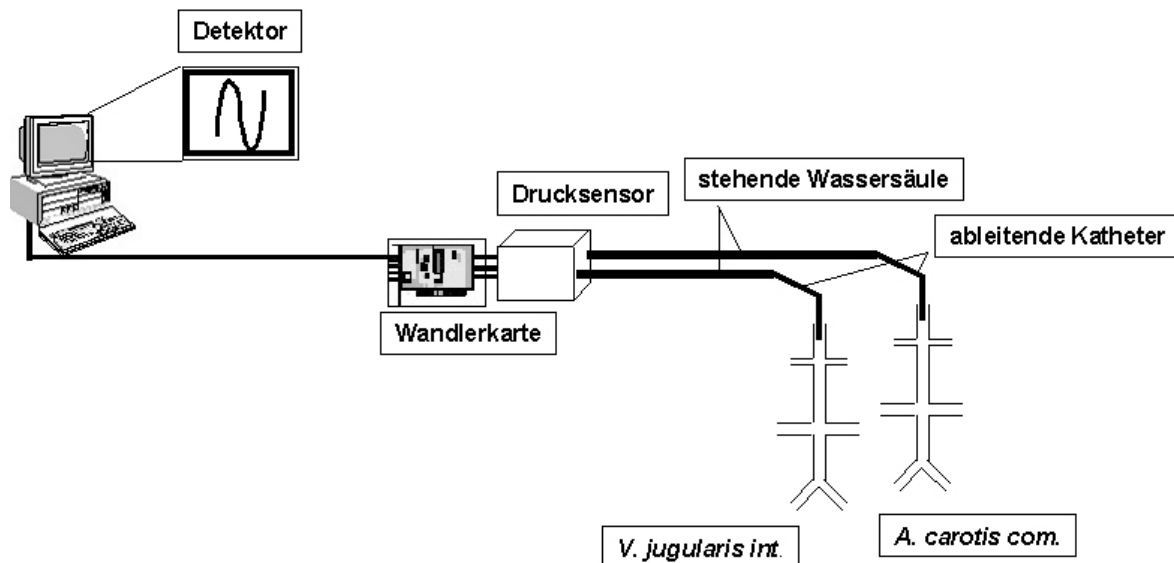
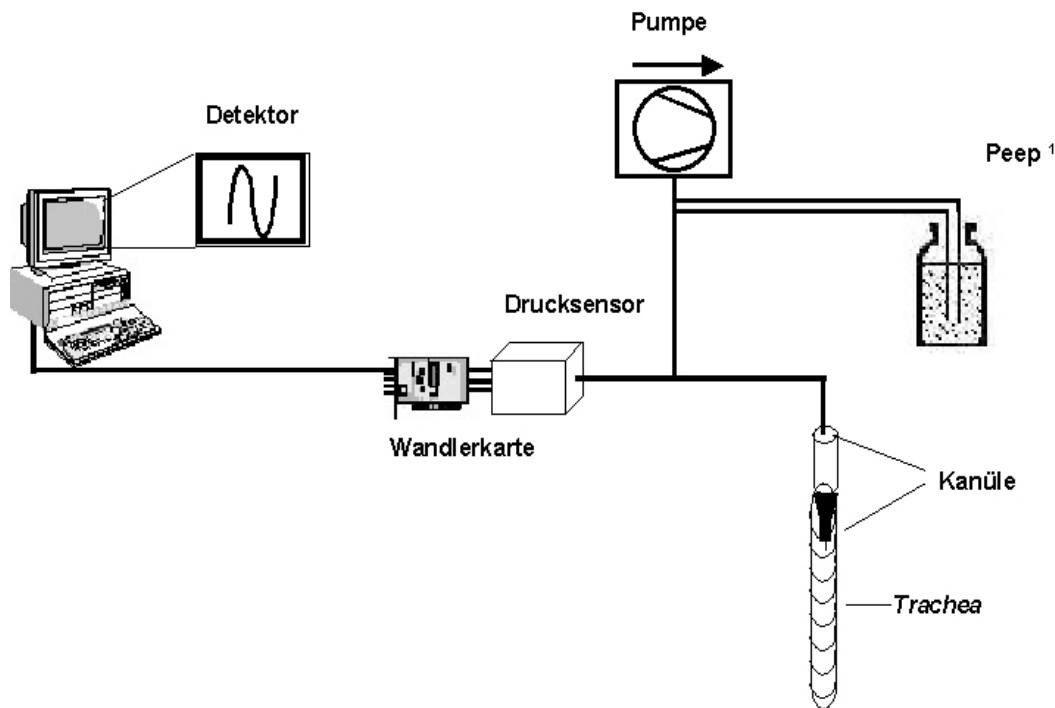


Abbildung 2-1: Blutdruckmessung

## 2.5 VENTILATION

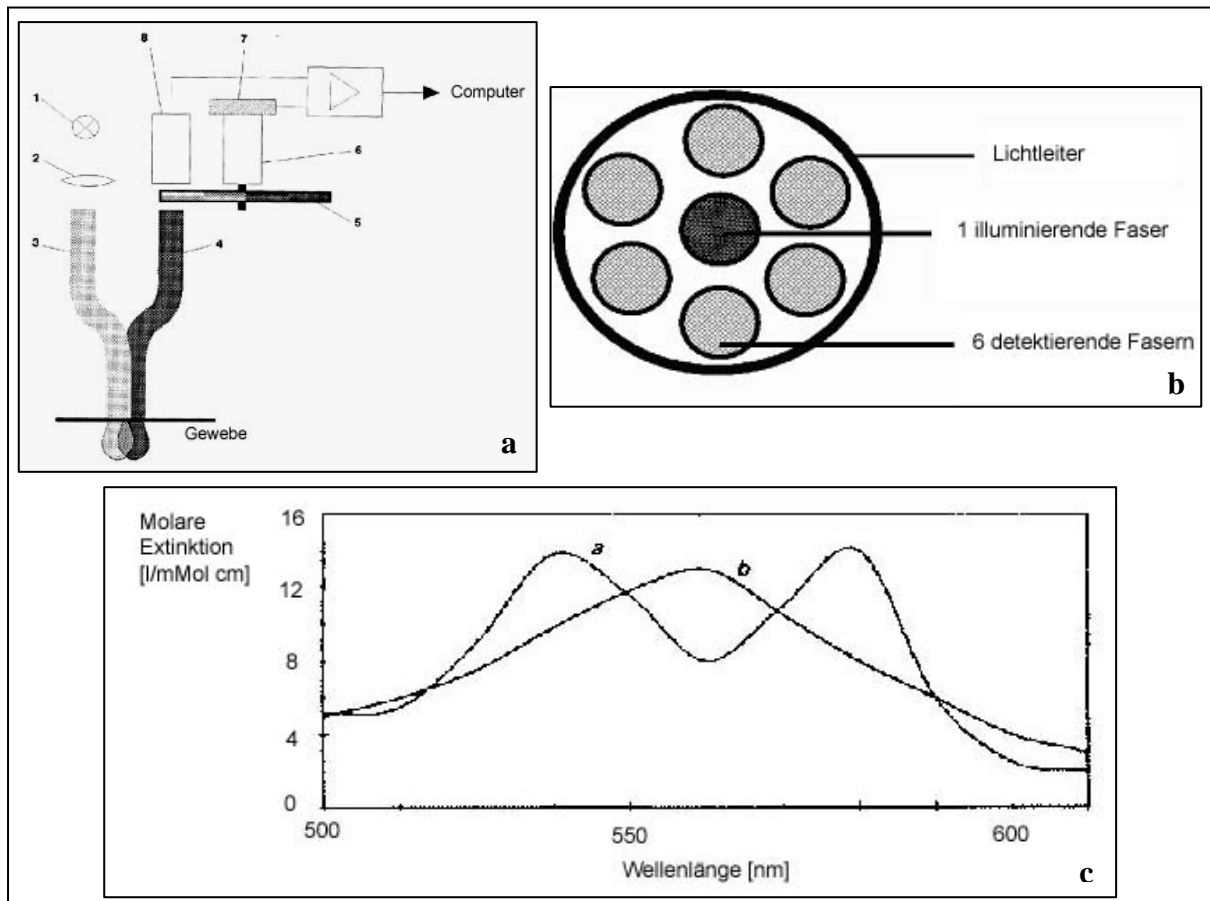
Die Ventilation erfolgte über die gesamte Versuchsdauer. Um eine vollständig kontrollierte Beatmung zu gewährleisten, erfolgte eine Relaxierung der Versuchstiere durch eine Pancuronium-Infusion. Ventiliert wurden die Tiere mit einem Atemzugvolumen von 3 ml, bei einer Atemfrequenz von 60/min und einem positiv endexpiratorischem Druck (PEEP) von 1 cm Wassersäule mit einem 1:1 Gemisch aus Stickstoff und Sauerstoff. Während des Versuchs erfolgte die Aufzeichnung der Beatmungsdrücke (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2:** Beatmungssystem; Positive endexpiratoric pressure [<sup>1</sup>Peep]

## 2.6 EMPHO II (ERLANGER MIKROLICHTLEITER–SPEKTRO–PHOTOMETER)

Das EMPHO II (Abbildung 2-3) beruht auf dem Prinzip der Reflexionsspektroskopie, wobei Licht einer Xenonlampe über ein Linsensystem auf die illuminierende Faser eines flexiblen Kunststofflichtleiter fokussiert und durch Oberflächenkontakt auf das Gewebe übertragen wird. Der reflektierte Lichtanteil wird über detektierende Fasern des gleichen Lichtleiters aufgenommen. Der Lichtleiter besteht aus einer illuminierenden Faser mit einem Durchmesser von 250 µm sowie 6 konzentrisch angeordneten detektierenden Fasern des gleichen Durchmessers (Abbildung 2-3). Die vom Lichtleiter beleuchtete Gewebefläche betrug ca. 750-1000 µm im Durchmesser mit einer Gewebepenetrationstiefe von max. 400 µm. Eine rotierende Filterscheibe mit variabler Lichtdurchlässigkeit von 500 bis 630 nm lässt das vom Gewebe reflektierte Licht in Abständen von 2 nm passieren und über einen Positionsdetektor erfolgt die Registrierung der einzelnen Filterpositionen. Das empfangene Lichtsignal wird in einen elektrischen Impuls transformiert, verstärkt und mittels eines Computers analysiert. Der Computer nimmt alle Daten auf, speichert sie und stellt sie grafisch als Spektren dar, aus denen die Hb-Oxygenierung und die relative Hb-Konzentration berechnet werden können.



**Abbildung 2-3:** Schematische Darstellung des **EMPHO II (Erlanger Mikrolightleiter-Spektrophotometer)** a: (1) Lampe, (2) Fokussieroptik, (3) Sendefaser, (4) Empfangsfaser, (5) Filterscheibe, (6) DC-Motor, (7) Decoder, (8) Photomultiplier; b: Lichtleiter; c: Graphische Darstellung der Hb-Oxygenierung: a Kurve guter Hb-Oxygenierung, b Kurve schlechter Hb-Oxygenierung

## 2.7 THERAPIE-INTERVENTIONEN

Unter Kontrolle der verschiedenen Parameter erfolgten unterschiedliche Therapieverfahren. Präparation, LPS-Injektion, Inkubationszeit und Anästhesie wurden in allen Gruppen konstant gehalten, so dass sich die verschiedenen Therapiegruppen nur anhand der durchgeführten Therapie unterschieden.

### 2.7.1 VOLUMEN-THERAPIE

Da der septische Schock durch massive Flüssigkeitsverschiebungen vom Intra- in den Extravasal-Raum geprägt ist, wurde bei der ersten Therapie-Gruppe eine alleinige Volumen-Therapie in Form physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt.

Dieses Volumen betrug 15 ml pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG) x h und wurde kontinuierlich per Infusionen mit einem Perfusor injiziert (15 ml/kg x h).

### **2.7.2 KATECHOLAMIN-THERAPIE**

Zur Kompensation des massiven Blutdruckabfalls durch Abnahme des peripheren Widerstandes wurde der zweiten Versuchsgruppe kontinuierlich Noradrenalin in einer Dosierung von 0,01 bis 10 µg pro Kilogramm Körpergewicht x min gelöst in physiologischer Kochsalzlösung per Infusionem zugeführt (0,01-10 µg/kg x min).

### **2.7.3 L-NMMA**

Zur nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibition wurde eine weitere Therapie-Gruppe mit L-NMMA als Inhibitor aller NO-Synthase-Untergruppen behandelt. Dieses wurde in physiologischer Kochsalzlösung angesetzt und in einer Dosierung von 150 µg pro Kilogramm Körpergewicht (kg/KG) x min als Infusion verabreicht (150 µg/kg x min).

### **2.7.4 1400W**

Als spezifischer Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) kam in der letzten Therapiegruppe die Substanz 1400W zum Einsatz. 1400W, ein spezifischer iNOS-Inhibitor, wurde in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und als Bolus in einer Dosierung von 3mg pro Kilogramm Körpergewicht über einen Zeitraum von 2 Minuten intravenös injiziert. Die Wahl der Verabreichungs-Form der Substanz als Bolus oder Infusion erfolgte durch diverse Vorversuche.

## **2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte (MW) ± Standardfehler (SEM). Die einzelnen Werte waren normalverteilt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch Varianzanalyse und einen Student-Newman-Keuls post-hoc Test für multiple Vergleiche ermittelt (p-Wert <0.05).



### 3 ERGEBNISSE

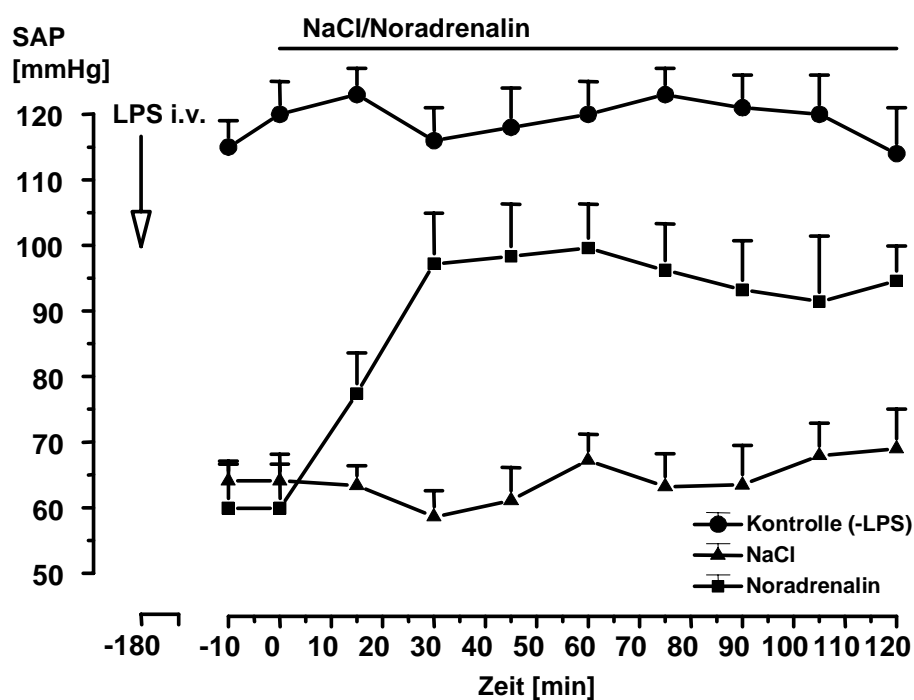
#### 3.1 KONTROLL- UND STANDARDBEDINGUNGEN

Bei den Kontrolltieren zeigten sich die hämodynamischen Parameter und arteriellen Blutgase in physiologischen Bereichen (Abbildungen 3-1, Tabelle 3-1). Der systemisch arterielle Druck blieb nach der dreistündigen Inkubationszeit über die gesamte Versuchsdauer von 2 Stunden konstant und zeigte keine großen Schwankungen. Ebenso unterlagen die rechtsventrikulären Drücke während der Aufzeichnungen kaum Schwankungen und bewegten sich in den 120 Minuten in engen Grenzen (Abbildung 3-2). Die maschinelle Beatmung sorgte für eine suffiziente Sauerstoffversorgung, so dass sich der arterielle  $pO_2$  nicht signifikant änderte und sich im Bereich zwischen 200 und 240 mmHg bewegte. Die arterielle  $CO_2$ -Konzentration konnte durch die künstliche Beatmung gut gesteuert und so im unteren Referenzbereich gehalten werden. Dadurch konnten insgesamt sehr befriedigende metabolische Verhältnisse geschaffen werden, resultierend in einem arteriellen pH-Wert von etwa 7,34 (Tabelle 1).

Ebenso wie die systemische Makrozirkulation zeigte auch die Mikrozirkulation, gemessen anhand der ilealen Mucosa-Hämoglobin-Oxygenierung, in den Kontrolltieren sehr konstante Bedingungen. Es wurde eine sehr enge Verteilung der relativen Hämoglobin-Oxygenierung mit Werten im wesentlichen zwischen 40% und 60 % gemessen, welche sich während des Versuchs nicht bedeutend änderte (Abbildung 3-3). Werte einer relativen Hämoglobin-Oxygenierung unter 30% und über 70 % kamen praktisch nicht vor, so dass sich annähernd 90 % der gemessenen Konzentrationen zwischen 40 % und 60 % bewegten. Gleiches galt für den Laktatspiegel, der am Ende des Versuchs Werte im nicht messbaren Bereich zeigte. Am Ende der Versuchsdauer lag der Plasma-Nitrat-Spiegel bei ungefähr 15  $\mu\text{mol/l}$  (Abbildung 3-4).

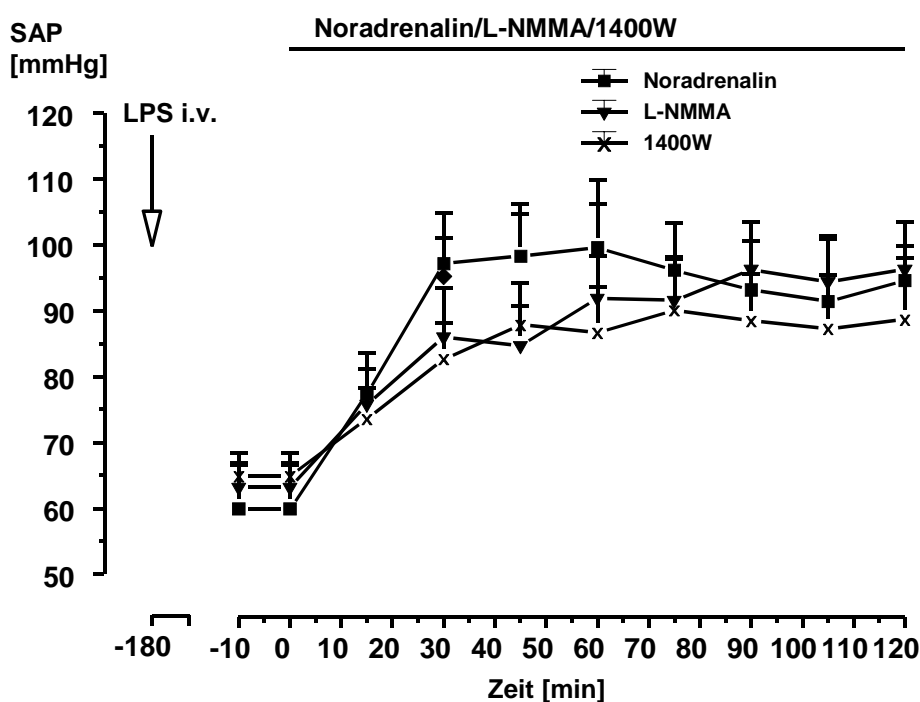
### 3.2 THERAPIE DER HYPOTENSION

Wie zu erwarten, zeigten nach Induktion des septischen Schocks mittels intravenöser Endotoxingabe nach Verabreichung der bakteriellen Wirkstoffe und Verstreichen einer dreistündigen Inkubationszeit alle Versuchstiere Zeichen eines schweren Kreislaufschocks. Die Tiere reagierten wenig auf ihre Umwelt, zeigten eine verstärkte Atmung mit erhöhter Atemfrequenz, der Blutdruck war deutlich gesenkt. Auf kontinuierliche Volumengabe zeigten die Versuchstiere praktisch keine Reaktion. Eine wesentliche Blutdrucksteigerung konnte hierunter nicht erreicht werden (Abbildung 3-1 A).



**Abbildung 3-1 A:** Einfluss von Noradrenalin oder physiologischer Kochsalzlösung auf den systemisch arteriellen Blutdruck [SAP] gemessen in der *Arteria carotis communis*. Angegeben ist der systemisch arterielle Blutdruck mit dem Standardfehler von jeweils sechs unterschiedlichen voneinander unabhängigen Experimenten. Mit Pfeil angezeigt wird die LPS-Injektion (1,5 mg/kg). Horizontale Balken zeigen Infusionen von Kochsalz (15 ml/kg x h) und Noradrenalin (0,01 bis 10 µg/kg x min) an. Im Vergleich zur Kochsalzinfusion sind die Werte bei Noradrenalin-Infusion an allen Zeitpunkten signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ).

Demgegenüber konnte mit der Therapieintervention einer kontinuierlichen Noradrenalin-Infusion eine deutliche Blutdrucksteigerung erreicht werden (Abbildung 3-1 A, 3-1 B). Diese wurde zunächst so austitriert, dass zu Beginn der Therapiephase eine annähernde Wiederherstellung des systemischen Blutdruckes zu verzeichnen war. Die Noradrenalin-Infusion wurde dann so eingestellt, dass sie dem Bedarf des Blutdruckerhaltes entsprach. Die Behandlung der septischen Versuchstiere mit dem nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA erfolgte ebenfalls durch eine kontinuierliche Infusion. Diese kontinuierliche Infusion führte zu einem Ansteigen des systemisch arteriellen Blutdruckes in etwa auf das Level der Noradrenalin-behandelten Ratten (Abbildung 3-1 B). Die Konzentration der zugeführten Infusions-Menge wurde über die gesamte Versuchsdauer konstant gehalten. Hierunter zeigte sich ein zunächst konstanter Anstieg des systemisch arteriellen Blutdruckes mit Ausbildung eines Plateaus gegen Ende der Versuchsdauer.

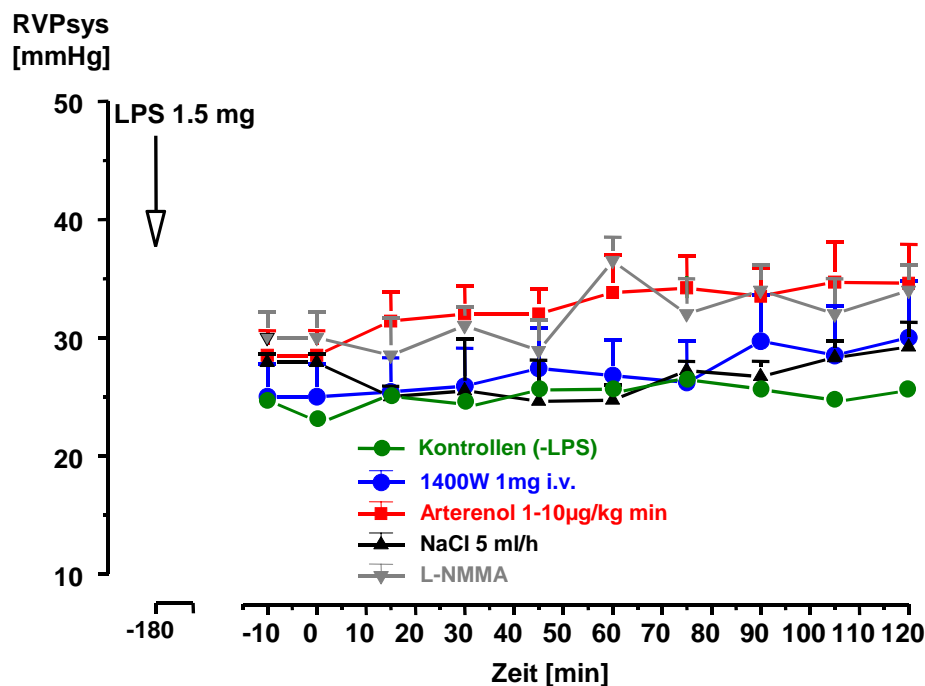


**Abbildung 3-1 B:** Einfluss von Noradrenalin oder NO-Synthase-Inhibitoren auf den systemisch arteriellen Blutdruck [SAP] gemessen in der *Arteria carotis communis*. Angegeben ist der systemisch arterielle Blutdruck mit dem Standardfehler von jeweils sechs unterschiedlichen voneinander unabhängigen Experimenten. Mit Pfeilen angezeigt werden einerseits die LPS-Injektion (1,5 mg/kg) und die Applikation von 1400 W (3 mg/kg). Horizontale Balken zeigen Infusionen von Kochsalz (15 ml/kg x h), Noradrenalin (0,01 bis 10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min) an. Im Vergleich zur Kochsalzinfusion sind die Werte bei Noradrenalin-Infusion an allen Zeitpunkten signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ). Das gleiche gilt für L-NMMA und 1400 W.

Die Verabreichung des selektiven iNOS-Inhibitors 1400 W nach dreistündiger Inkubationszeit erfolgte durch einmalige intravenöse Bolus-Applikation. Aus der Gabe des Bolus resultierte ein anhaltender Anstieg des Blutdruckes, welcher nach etwa 45 Minuten in einem Plateau mündete. Dieser erreichte Blutdruckanstieg wurde über die gesamte Versuchsdauer von 2 Stunden konstant gehalten (Abbildung 3-1 B).

### 3.3 RECHTSVENTRIKULÄRE DRUCKVERHÄLTNISSE

Der systemisch rechtsventrikuläre Druck zeigte sich in allen Versuchsgruppen relativ konstant. Weder die kontinuierliche Volumen-Gabe noch die Katecholamin-Therapie hatte einen großen Einfluss auf die über den im rechten Ventrikel platzierten Druckaufnehmer registrierten Werte. Auch die nicht-selektive NOS-Hemmung und die selektive iNOS-Inhibition übten keine große Wirkung auf die rechtsventrikulären Blutdruckverhältnisse aus (Abbildung 3-2).



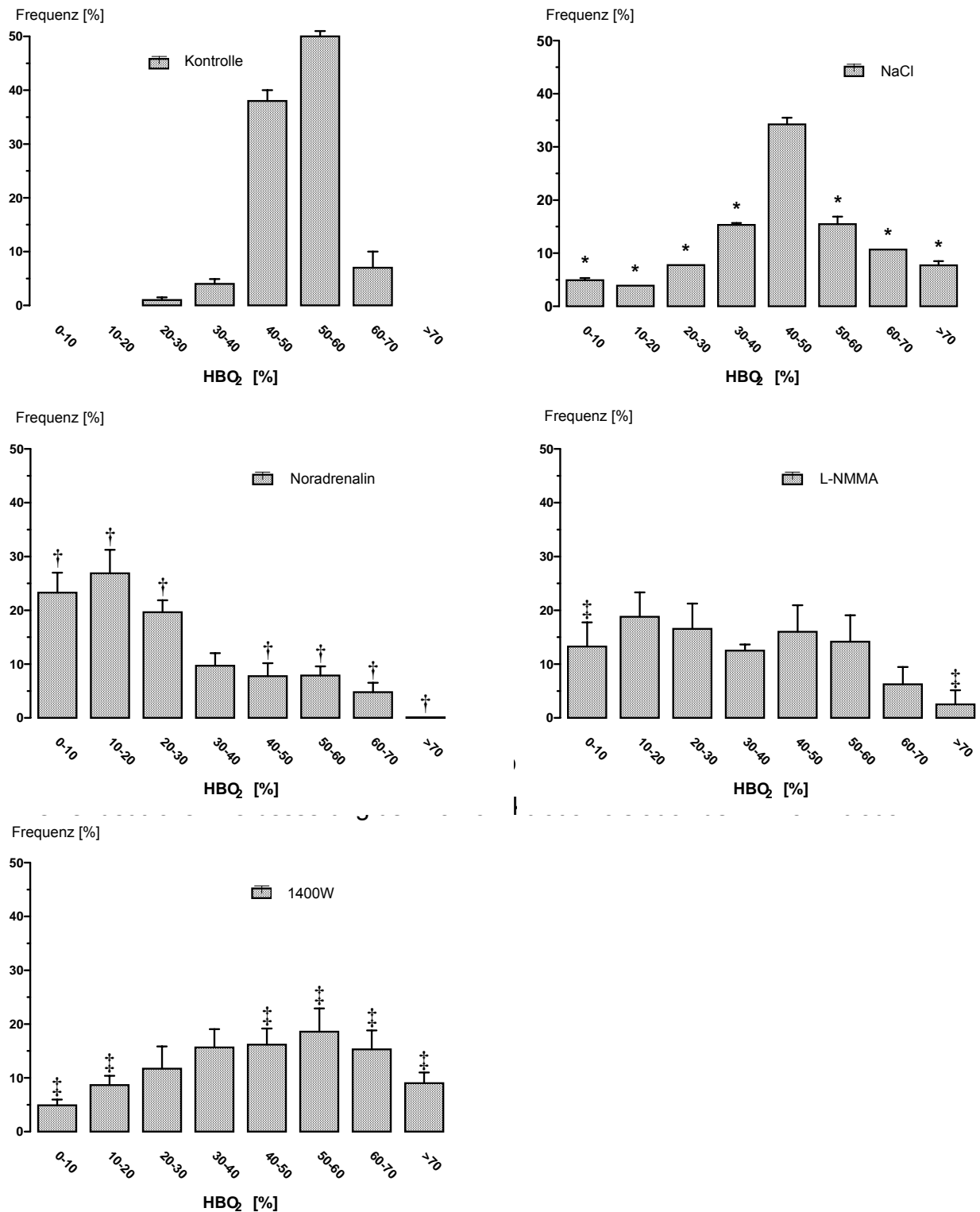
**Abbildung 3-2:** Dargestellt ist der Einfluss von Noradrenalin oder NOS-Inhibitoren auf den systemischen rechtsventrikulären Druck (RVPsys) mit der Standardabweichung von jeweils sechs voneinander unabhängigen Experimenten (Mittelwert  $\pm$  Standard-Abweichung). LPS-Injektion (1,5 mg/kg) oder die Applikation von 1400 W (3 mg/kg) sind durch Pfeile angezeigt. Horizontale Balken zeigen Infusionen von Kochsalz (15 ml/kg x h), Noradrenalin (0,01 bis 10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min) an.

### 3.4 MIKROZIRKULATION

Wie die systemische Makrozirkulation zeigte auch die Mikrozirkulation eine deutliche Beeinträchtigung durch das septische Geschehen. Dies konnte mittels der Technik der EMPHO-II-Messstation anhand der ilealen Hämoglobin-Oxygenierung der Mucosa demonstriert werden (Abbildung 3-3).

Im Gegensatz zur Hämoglobin-Oxygenierung der ilealen Mucosa der Kontrolltiere, bei welchen sich vor allem Werte in den Bereichen von 30 % bis 40 % sowie 40 % bis 50 % zeigten und Werte unter 30 % und über 70 % nahezu nicht auftraten, führte die Induktion des septischen Schocks zu einer Verbreiterung der Werte-Verteilung mit Abnahme im Bereich mittlerer Hämoglobinoxygenierung von 40 % bis 60 % und Zunahme höherer und niedrigerer Werte von über 70 % und unter 30 %. Diese deutliche Verbreiterung, hin zu extremeren Werten, deutet auf eine Missverteilung der regionalen Perfusion hin.

Der Therapieversuch der Volumengabe führte zu keiner wesentlichen Besserung der Verhältnisse. Gravierende Veränderungen des Spektrums der Hämoglobin-Oxygenierung innerhalb der ilealen Mucosa bzw. der mucosalen Mikrozirkulation zeigten sich bei der Versuchsgruppe der Noradrenalin-behandelten Versuchstiere (Abbildung 3-3). Hier zeigten sich deutlich schlechtere Verhältnisse. Die Anzahl der Gebiete mit Hämoglobin-Oxygenierungswerten zwischen 0 % und 10 %, 10 % und 20 % sowie 20 % und 30 % waren im Vergleich zu den Volumen-behandelten septischen Tieren und der Kontrollgruppe deutlich gestiegen (Abbildung 3-3). Das Diagramm zeigt einen eindeutig linksgipfeligen Verlauf, hin zu Gebieten niedriger Oxygenierung und einer dramatischen Abnahme der Anzahl der Areal mit 40 % bis 70 % iger Hämoglobin-Oxygenierung. Somit konnte in dieser Versuchsgruppe zwar eine klare Verbesserung der makrozirkulatorischen Verhältnisse erreicht werden, dies jedoch auf Kosten einer eindeutigen Verschlechterung der mucosalen Mikrozirkulation. Die Gabe des nicht-selektiven NO-Synthase-Inhibitors L-NMMA hingegen erzielte im Vergleich zur Noradrenalintherapie im Bereich der Mikrozirkulation eine eindeutige Verbesserung. Verglichen mit den Noradrenalin-behandelten Ratten wurde eine signifikante Abnahme der Anzahl der Gebiete mit Hämoglobin-Oxygenierungen von 0 % bis 10 % und 10 % bis 20 % gemessen. Insgesamt zeigte der Kurvenverlauf der Verteilung der Hämoglobin-Oxygenierungswerte eine breitere Streuung der Werte ohne Gipfel (Abbildung 3-3).

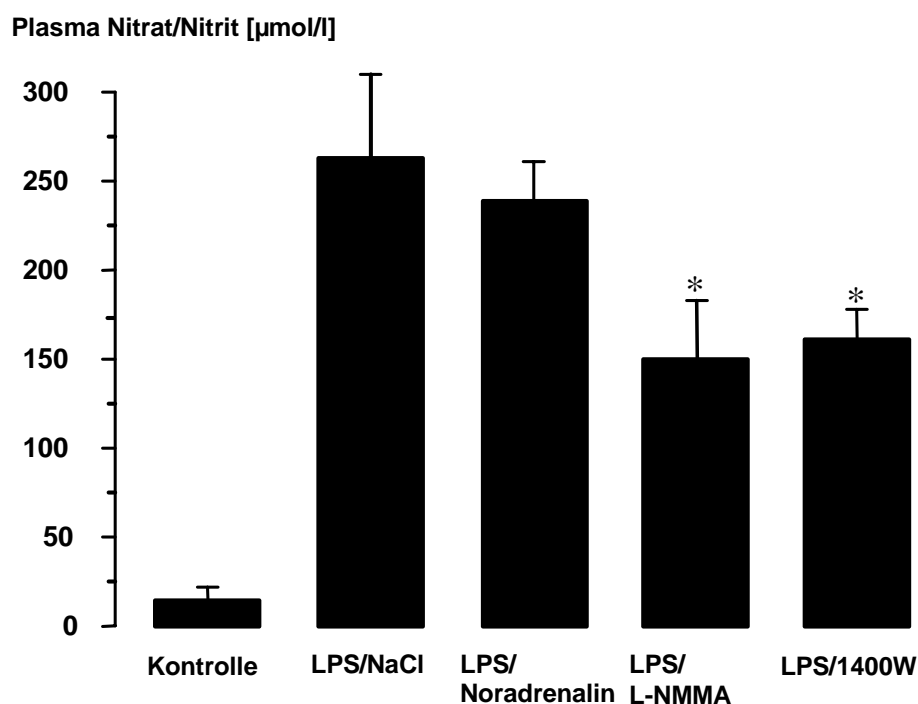


**Abbildung 3-3:** Dargestellt ist die Verteilung der HbO<sub>2</sub>-Werte in der ilealen Mucosa von Kontrolltieren, septischen Tieren und solchen, die den unterschiedlichen Behandlungs-Regimen unterzogen wurden. Für jede Gruppe wurden die Daten gesammelt dargestellt. Die Histogramme repräsentieren die Verteilung der HbO<sub>2</sub>-Werte (14 000 Werte pro Experiment) von 6 voneinander unabhängigen Experimenten (Mittelwert +/- Standardfehler). Drei Stunden nach der intravenösen LPS-Injektion von 1,5 mg/kg erhielten die Tiere Infusionen von Kochsalz (15 ml/kg x h), Noradrenalin (0,01 bis 10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min). In anderen Fällen erfolgte zu diesen Zeitpunkten eine Bolus-Applikation 1400 W. \* p<0,05 vs. Kontrolltiere; + p<0,05 vs. NaCl-behandelte Tiere; † p<0,05 vs. Noradrenalin-behandelte Tiere:

Die Bolusgabe des selektiven iNOS-Inhibitors 1400W wiederum führte sowohl zu einer deutlichen Verbesserung der Makrozirkulation als auch der Mikrozirkulation. Gegenüber der Katecholamin-Therapie und der nicht-selektiven NOS-Hemmung zeigte sich eine eindeutige Rechtsverschiebung der mucosalen Hämoglobin-Oxygenierungs-werte mit einer Verminderung der Areale niedriger Sättigung mit Werten zwischen 0 % und 10 % und 10 % und 20 % und einer Steigerung der Anzahl höher oxygenierter Areale von 40 % bis 70 % (Abbildung 3-3).

## ENTWICKLUNG DER PLASMA-NITRAT-/NITRIT-SPIEGEL UNTER VERSCHIEDENEN THERAPIEREGIMEN

Nach Verstreichen einer dreistündigen Inkubationszeit nach LPS-Gabe erfolgte die zweistündige Versuchsphase. Anschließend wurde unter anderem der Plasma-Nitrat-Spiegel, als sensibler Parameter für die verstärkte NO-Freisetzung, bestimmt. Wie aus Abbildung 3-4 ersichtlich, führte die Induktion des septischen Schocks dabei zu stark erhöhten Werten gegenüber den Kontrollen. Volumen- und Katecholamin-Therapie vermochten diese erhöhten Werte nur geringfügig zu reduzieren. Eine eindeutige Reduktion der Plasma-Nitrat-Spiegel gelang sowohl mit der selektiven als auch der nicht-selektiven NOS-Hemmung, wobei die größte Verringerung der erhöhten Werte mit dem nicht-selektiven NOS-Hemmer L-NMMA gelang.

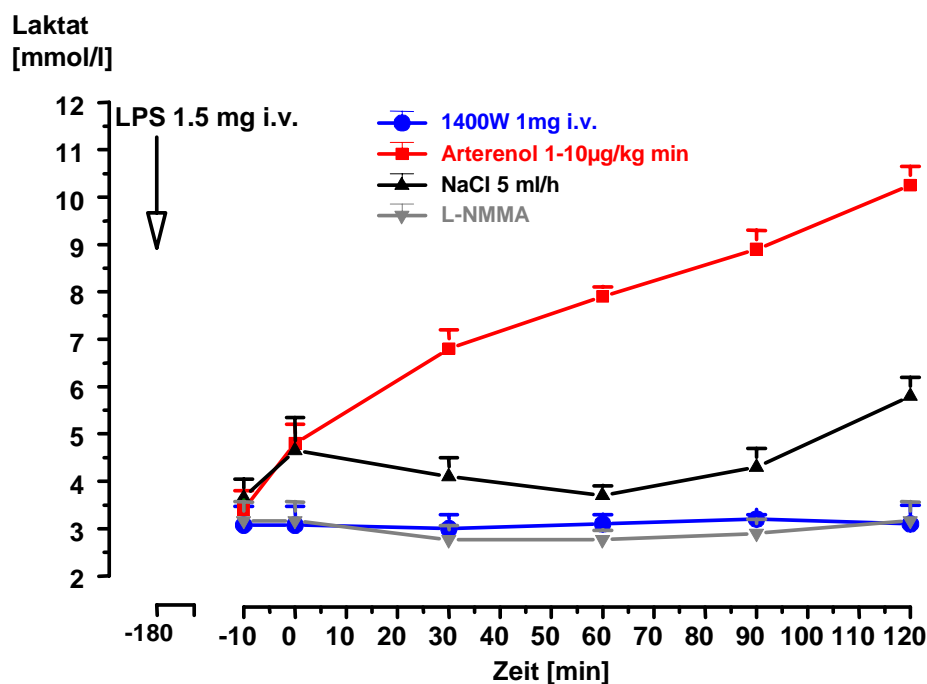


**Abbildung 3-4:** Plasma-Nitrat-Spiegel von Ratten, welche LPS ausgesetzt waren und mit verschiedenen Therapieregimen behandelt wurden. Drei Stunden nach LPS-Injektion erfolgten Infusionen von Kochsalz [NaCl] (15ml/kg x h), Noradrenalin (0.01-10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min). Alternativ erfolgte zum selben Zeitpunkt eine Bolusgabe 1400W (3mg/kg). Die Werte zeigen Mittelwerte  $\pm$  SA von jeweils 6 unabhängigen Experimenten. \*,  $p < 0.05$  gegenüber NaCl-behandelten Tieren



### 3.6 PLASMA-LAKTAT-SPIEGEL UND pH-WERTE

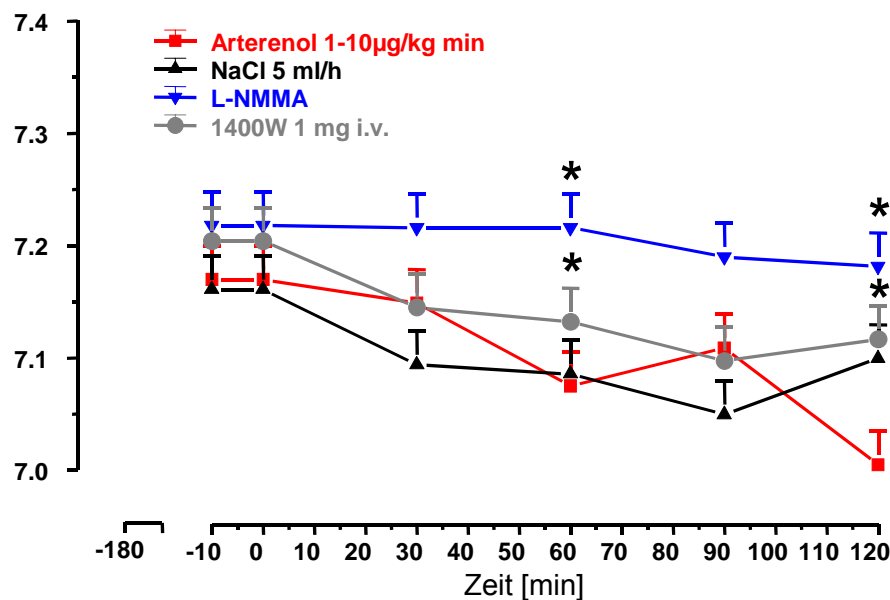
Die Plasma-Laktat-Spiegel und pH-Werte in den einzelnen Versuchsgruppen zeigten eine große Varianz auf (Abbildung 3-5, 3-6, Tabelle 1). In der Gruppe der mit Volumengabe therapierten Versuchstiere zeigte sich mit zunehmender Versuchsdauer ein Ansteigen des Laktatspiegels bis auf 5,8 mmol/l und parallel dazu ein Absinken des pH-Wertes auf 7,10. Diese Veränderungen zeigten sich nicht derart ausgeprägt wie dies in der Gruppe der mit Katecholaminen behandelten Tiere der Fall war. Die Arterenol-Gabe führte hier zu dramatischen Veränderungen sowohl des Laktatspiegels als auch des pH-Wertes. Als Ausdruck der zunehmenden Mikrozirkulationsstörungen in dieser Therapiegruppe und einem damit einhergehenden Wechsel von aeroben zu anaeroben Stoffwechselbedingungen konnte man über die gesamte Versuchsdauer ein kontinuierliches Ansteigen des Plasmalaktats bis auf Werte von 10,3 mmol/l beobachten und ein Absinken des pH-Wertes am Ende der zweistündigen Versuchszeit auf 7,00 beobachten.



**Abbildung 3-5:** Plasma-Laktat-Spiegel der Versuchsratten, die nach LPS-Gabe mit unterschiedlichen Therapieregimen behandelt wurden. Drei Stunden nach LPS-Injektion erhielten die Tiere Infusionen von Kochsalz [NaCl] (15 ml/kg x h), Noradrenalin (0.01-10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min). Alternativ erfolgte zum selben Zeitpunkt eine Bolusgabe 1400W (3 mg/kg). Horizontale Balken zeigen Zeitpunkte der Probe-Entnahmen. Bei den gesunden Versuchstieren war das Laktat nicht messbar.

Demgegenüber zeigte die selektive und die nicht-selektive NOS-Hemmung günstigere Effekte auf die metabolischen Verhältnisse der Versuchstiere. Die Plasmalaktatspiegel zeigten sich sowohl unter nicht-selektiver NOS-Inhibition mit L-NMMA als auch unter selektiver iNOS-Hemmung nach Gabe von 1400W mit Werten von 3,2 bzw. 3,3 mmol/l am Ende der Versuchsdauer über den gesamten Versuchszeitraum sehr konstant. Ebenso zeigten auch die gemessenen pH-Werte annähernd konstante Verläufe mit Werten von 7,18 bzw. 7,11 nach Gabe von 1400W.

pH-Werte



**Abbildung 3-6:** pH-Werte der Versuchsratten nach LPS-Gabe unter den verschiedenen Therapieregimen während des Versuchsverlaufes. Drei Stunden nach LPS-Injektion erhielten die Tiere Infusionen von Kochsalz [NaCl] (15 ml/kg x h), Noradrenalin (0.01-10 µg/kg x min) oder L-NMMA (150 µg/kg x min). Alternativ erfolgte zum selben Zeitpunkt eine Bolusgabe 1400W (3 mg/kg). Horizontale Balken zeigen Zeitpunkte der Probe-Entnahmen. Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen LPS/L-NMMA, LPS/1400W und LPS/Noradrenalin († = p<0.05) an.

	Kontrollen			LPS/NaCl			LPS/Noradrenalin			LPS/L-NMMA			LPS/1400W		
	0'	60'	120'	0'	60'	120'	0'	60'	120'	0'	60'	120'	0'	60'	120'
P <sub>a</sub> O <sub>2</sub> , mmHg	<b>246</b> ±10	<b>231</b> ±12	<b>242</b> ±8	<b>261</b> ±12	<b>244</b> ±14	<b>222</b> ±15	<b>252</b> ±12	<b>237</b> ±12	<b>231</b> ±12	<b>230</b> ±8	<b>247</b> ±10	<b>211</b> ±12	<b>240</b> ±12	<b>236</b> ±10	<b>202</b> ±9
P <sub>a</sub> CO <sub>2</sub> , mmHg	<b>33.5</b> ±4.0	<b>35.4</b> ±4.0	<b>33.6</b> ±2.2	<b>32.9</b> ±3.0	<b>32.6</b> ±4.0	<b>28.6</b> ±2.0	<b>27.8</b> ±2.1	<b>34.0</b> ±2.8	<b>35.6</b> ±2.5	<b>33.9</b> ±1.7	<b>35.6</b> ±1.1	<b>37.4</b> ±1.3	<b>30.1</b> ±1.8	<b>35.4</b> ±1.1	<b>34.6</b> ±1.8
pH <sub>a</sub>	<b>7.41</b> ±0.03	<b>7.32</b> ±0.02	<b>7.36</b> ±0.08	<b>7.16</b> ±0.07	<b>7.09</b> ±0.06	<b>7.10</b> ±0.08	<b>7.17</b> ±0.09	<b>7.08</b> ±0.09	<b>7.00</b> ±0.11	<b>7.22</b> ±0.09	<b>7.21<sup>†</sup></b> ±0.07	<b>7.18<sup>†</sup></b> ±0.07	<b>7.20</b> ±0.04	<b>7.13<sup>†</sup></b> ±1.06	<b>7.11</b> ±0.06
Laktat, mmol/l	<b>3.2</b> ±0.4	<b>3.3</b> ±0.4	<b>3.8</b> ±0.2	<b>3.6</b> ±0.4	<b>3.7</b> ±0.5	<b>5.8</b> ±0.3	<b>3.4</b> ±0.4	<b>7.9<sup>*</sup></b> ±0.2	<b>10.3<sup>*</sup></b> ±0.4	<b>3.2</b> ±0.2	<b>2.8<sup>†</sup></b> ±0.6	<b>3.3<sup>†</sup></b> ±0.4	<b>3.1</b> ±0.4	<b>3.1<sup>†</sup></b> ±0.2	<b>3.2<sup>†</sup></b> ±0.4
rel Hb <sub>Konz.</sub>	<b>1.00</b>	<b>1.02</b> ±0.15	<b>1.07</b> ±0.23	<b>1.00</b>	<b>1.07</b> ±0.15	<b>1.17</b> ±0.23	<b>1.00</b>	<b>1.12</b> ±0.12	<b>1.43<sup>*</sup></b> ±0.12	<b>1.00</b>	<b>1.28</b> ±0.21	<b>1.36</b> ±0.17	<b>1.00</b>	<b>1.11</b> ±0.12	<b>1.12<sup>†</sup></b> ±0.20

**Tabelle 3-1: Arterielle Blutgase und Laktat-Konzentration bei mit LPS behandelten Ratten in Antwort auf verschiedene Behandlungsstrategien.**

P<sub>a</sub>O<sub>2</sub>, arterieller PO<sub>2</sub>; pH<sub>a</sub>, arterieller pH; P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>, arterieller PCO<sub>2</sub>. Die Spalten geben die zusammengefassten Daten der Gruppen vor (0') und nach (60', 120') Gabe von Kochsalzinfusionen (15ml/kg x h über den gesamten Beobachtungszeitraum), Noradrenalin (0.01 bis 10 µg/kg x min), L-NMMA (150 µg/kg x min) und 1400W (3 mg/kg) wieder. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zwischen LPS/Noradrenalin und LPS/NaCl (\* = p<0.05) an; Kreuze zeigen signifikante Unterschiede zwischen LPS/L-NMMA, LPS/1400W und LPS/Noradrenalin († = p<0.05) an.

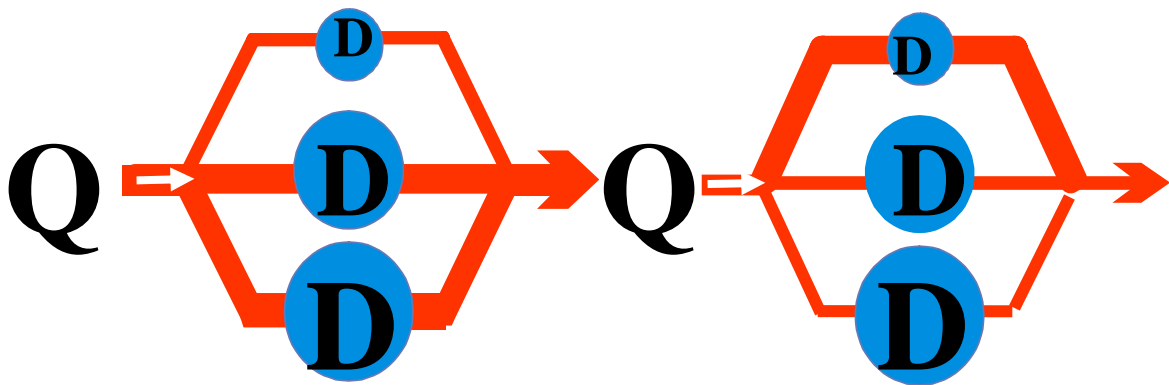
## 4 DISKUSSION

Septische Krankheitsgeschehen, wie der septische Schock, stellen intensivmedizinisch nach wie vor ein großes Problem dar. In dieser Studie sollte daher ein Modell des septischen Schocks etabliert werden, an welchem verschiedene Therapieansätze miteinander verglichen und mögliche neue Therapien aufgezeigt werden können. Vergangene Arbeiten zeigten auf, dass der septische Schock einen großen Einfluss auf die Regulationsmechanismen verschiedenster Gefäßgebiete hat und es ergaben sich Kontroversen über die Reaktion dieser Gefäßgebiete auf Endotoxin-Verabreichung. Somit erscheint es wichtig, neben den makrozirkulatorischen Effekten einer Therapie auch die Wirkung dieser auf die Mikrozirkulation zu evaluieren und die Änderung der Druckverhältnisse im Lungenkreislauf zu erfassen. In der Literatur werden des häufigeren Arbeiten über den septischen Schock beschrieben, welche zur Induktion des septischen Geschehens mit Modellen der intravenösen Endotoxin-Verabreichung arbeiten [3,7,12,27,54].

Auch in dieser Arbeit zeigten alle Endotoxin-behandelten Tiere nach Injektion des Lipopolysaccharids und Verstreichen einer dreistündigen Inkubationszeit Zeichen eines septischen Schocks und einer schweren Beeinträchtigung ihres Kreislaufes: Durch die intravenöse LPS-Injektion war der Blutdruck ernsthaft gesenkt und zeigte praktisch keine Reaktion auf Volumengabe (Abbildung 3-1). Die Tiere zeigten Zeichen einer metabolischen Azidose mit verstärkter und vertiefter Atmung, saurem pH-Wert und erhöhtem Blut-Laktat-Spiegel (Tabelle 1). Neben der schweren Beeinträchtigung der systemischen Makrozirkulation, geprägt durch den starken Blutdruckabfall, zeigte sich auch die Mikrozirkulation durch das septische Geschehen stark beeinträchtigt.

In den vergangenen Jahren hat sich die herausragende Rolle der mucosalen Perfusion für die Aufrechterhaltung der Barriere-Funktion des Gastrointestinaltraktes herausgestellt [6]. Ein Verlust dieser Funktion erleichtert wahrscheinlich die Translokation von Bakterien und bakterieller Toxine von diesen

Organen in die Zirkulation und hält somit die septische und inflammatorische Kaskade aufrecht [122,123]. Somit gibt es Autoren, die den Verdauungstrakt als den „Motor“ für die Entwicklung eines Multiorganversagens bezeichnen, sobald ein Sepsis- oder Schockgeschehen eingetreten ist [123]. Allerdings werden die Mechanismen, die für die Störungen der viszeralen Mikrozirkulation während einer Sepsis verantwortlich sind, noch nicht vollständig verstanden. In Modellen einer normotensiven Sepsis konnte gezeigt werden, dass es auch bei guten Blutdruckverhältnissen zu Perfusionsabnormalitäten der intestinalen Mucosa kommt und dass gerade der Beurteilung der Durchblutung der gegenüber einer Abnahme der Blutversorgung extrem empfindlichen intestinalen Villi bei Patienten mit septischen Krankheitsbildern somit eine entscheidende Rolle zukommt und Parameter der Makrozirkulation keine zuverlässigen Rückschlüsse auf die mikrozirkulatorische Perfusion zulassen. Die Anwendung der spektrophotometrischen Technik erlaubte eine Beurteilung der Durchblutungsverhältnisse der intestinalen Mucosa. Bereits in einigen vorangegangenen Arbeiten stellte sich die Reflexionsspektroskopie mit dem Erlanger Mikrolichtleiter-Spektro-Photometer II (EMPHO II) als eine leistungsfähige Technik zur Erfassung der Hämoglobin-Oxygenierung der Mucosa heraus und wurde mehrfach unter experimentellen Bedingungen angewandt [136,138]. Die mikrovaskuläre Hämoglobin-Oxygenierung reflektiert dabei das Gleichgewicht zwischen regionaler Sauerstoff-Zufuhr und Sauerstoff-Aufnahme. Bereits zu Beginn des septischen Krankheitsgeschehens ließen sich schwerwiegende mikrozirkulatorische Abnormalitäten nachweisen. Es zeigten sich Perfusions-Heterogenitäten in der ilealen Mucosa. Die ileale Mucosa der Kontrolltiere war durch eine sehr homogene Gewebe-Oxygenierung gekennzeichnet. Durch vorherrschende intakte Regulationsmechanismen erfolgte eine kontrollierte Perfusion mit Werten der relativen Hämoglobin-Oxygenierung im wesentlichen zwischen 40% und 60 %. Etwa 90 % der Messwerte bewegten sich in diesem Bereich. Diese Bedingungen änderten sich während des Versuchszeitraumes nicht bedeutend und es zeigte sich somit eine mikrovaskuläre Stabilität des Präparats über den gesamten Untersuchungszeitraum. Die Induktion des septischen Schocks hingegen führte in der Mucosa zu ernsthaften Perfusions-Abnormalitäten.



**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung der Durchblutung (Q) im Verhältnis zum Bedarf (D) und Gefäßdurchmesser; links bei intakter und rechts bei gestörter Gefäßregulation mit vermehrter Durchblutung von Arealen verminderten Bedarfs und verminderter Durchblutung von Arealen hohen Bedarfs.

Es zeigte sich eine deutliche Verbreiterung der gemessenen Werte für die Hämoglobin-Oxygenierung. Neben Arealen sehr hoher Hämoglobin-Oxygenierung zeigten sich Gebiete mit sehr niedrigen Werten. Somit kam es zu einem Verlust der homogenen Perfusionsverhältnisse und die intestinale Mucosa zeigte eine deutliche Heterogenität der Durchblutung. Diese breite Verteilung des Oxygenierungsmusters deutet insgesamt stark auf eine Fehlverteilung der Perfusion der gesamten mucosalen Oberfläche des Körpers hin. In einer Arbeit von *Temmesfeld-Wollbrück et al.* [5] konnte ebenfalls eine deutliche Heterogenität der Durchblutung der Mucosa mit ernsthaft hypoxischen Arealen bei Patienten im septischen Schock anhand der spektrophotometrischen Untersuchung mit Messung der Hämoglobin-Oxygenierung der Magenschleimhaut nachgewiesen werden. Da die mikrovaskuläre Hämoglobin-Oxygenierung das Gleichgewicht zwischen regionaler Sauerstoff-Zufuhr und Sauerstoff-Aufnahme reflektiert, müssen die gemessenen verminderten Werte der Hämoglobin-Oxygenierung laut *Temmesfeld-Wollbrück et al.* [5] entweder auf einer Abnahme der Zufuhr oder einer erhöhten Aufnahme oder einer Kombination beider Möglichkeiten beruhen [5]. Insgesamt deuten viele Arbeiten eher auf Perfusions-Abnormitäten als Ursache für eine Reduktion der Hämoglobin-Oxygenierung hin, zumal sich in der vorliegenden Arbeit neben verminderten auch erhöhte Werte zeigten.

Vorangegangene Arbeiten, welche mit unterschiedlichen Techniken arbeiteten, erzielten ähnliche Ergebnisse, die belegen, dass gerade das intestinale Mucosa-Kompartiment besonders empfindlich auf die Sepsis oder SIRS mit mikrozirkulatorischen Abnormitäten reagiert. Interessanterweise stellen sich diese mikrozirkulatorischen Abnormitäten mit Gewebhypoxie mit gesteigerter Laktatproduktion und gleichzeitigen Gebieten mit erhöhter Perfusion und der Entstehung mucosaler Läsionen des Gastrointestinaltraktes bei Bedingungen einer normotensiven Sepsis [24,26,143], bei normaler Organdurchblutung [140] und auch bei ausreichender Volumengabe [111] dar.

Insgesamt ist die Verteilung des Blutflusses in der Wand des Verdauungstraktes nicht homogen. Um eine gute Sauerstoffversorgung der Mucosa zu gewährleisten, ist der mittlere mucosale Blutfluss zwei bis vier mal größer als der Blutfluss in der Muscularis [142]. *Vallet et al.* beschrieben bei Bestehen eines Schocks eine deutliche Umverteilung der Durchblutung innerhalb der intestinalen Wand weg von der Mucosa hin zur Muscularis [143]. Andere Autoren beschrieben bei langsamer Infusion niedrig-dosierten Endotoxins bei Pferden einen erhöhten Gefäßwiderstand im Jejunum resultierend aus einem erhöhtem präkapillären Widerstand [144]. *Schmidt et al.* [26], welche ebenfalls mit einem Sepsis in-vivo-Modell arbeitenden, verwendeten videomikroskopische Methoden zur Messung des Blutflusses in den villösen Arteriolen. Sie registrierten eine Reduktion des villösen Blutflusses nach Induktion des septischen Schocks und interpretierten diese Reduktion als das Ergebnis einer Vasokonstriktion der prävillösen und der villösen arteriolen Gefäße zur Umverteilung der Durchblutung weg vom Splanchnikusgebiet im Sinne einer Zentralisation zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden Herzzeitvolumens in der kompensatorischen Phase einer Endotoxinämie.

Die Persistenz der pathologischen Vorgänge in der intestinalen Mucosa bei adäquater Volumenzufuhr, ausreichender Organdurchblutung und normalen Blutdruckverhältnissen lässt, wie bereits diskutiert, entweder auf regulatorische Reaktionen der intestinalen Mikrozirkulation während der Endotoxinämie schließen, welche die mucosale Perfusion trotz gesteigerter Blutzufuhr zu den Organen reduzieren oder auf ein lokales Ungleichgewicht der Bildung vasoaktiver Mediatoren. Eine mögliche Erklärung stellt eine unphysiologische regionale NO-Bildung dar.

Gestützt wird diese These einerseits durch die dramatisch erhöhten Plasma-Nitrat-Spiegel bei endotoxischen Ratten [12,43,116,119] (Abbildung 3-4) und andererseits durch den Nachweis einer Hochregulation der iNOS und einer gesteigerten Expression der iNOS mRNA [2,12,18,28,29,40,113,117]. Weiterhin zeigte sich in Arbeiten mit iNOS-Knockout-Mäusen eine sehr viel geringere Empfindlichkeit gegenüber LPS-Gabe [13,29,114,120], was wiederum im Gegensatz zur These einiger Autoren einer erhöhten eNOS-Aktivität im Rahmen einer LPS-induzierten Hypotension steht [145,146]. Einige Autoren vermuten neben den Effekten einer gestörten Durchblutung der Mikrozirkulation auch eine abnorme Sauerstoffverwertung als einen wesentlichen Faktor für die beobachteten Zellschädigungen im Rahmen septischer Geschehen [101]. Ebenso wird eine Beteiligung nicht-ischämischer Prozesse, einschließlich der Aktivierung intrazellulärer Enzyme [107,115] und des Immunsystems [118,125,126] und eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung [101,139], an dem Entstehen Endotoxin-induzierter mucosaler Schädigungen diskutiert.

Zur Zeit ist eine wichtige Therapieoption bei Patienten im septischen Schock, welche nicht adäquat auf eine Volumensubstitution reagieren, die Verabreichung adrenerger Substanzen, um eine Erhöhung des peripheren Widerstandes zu erreichen. Dabei wird hauptsächlich auf Noradrenalin zurückgegriffen. Auch bei dieser Arbeit konnte durch die Anwendung von Noradrenalin bei endotoxischen Tieren eine Wiederherstellung der systemischen Blutdruckwerte auf annähernd normale Werte erreicht werden. Die Titrierung von Noradrenalin mit gleichbleibender Erhaltungsdosis gewährleistete einen Erhalt der Blutdruckwerte über die gesamte Versuchsdauer. Allerdings musste für die Normalisierung der makrozirkulatorischen Durchblutungsverhältnisse eine weitere Verschlechterung der ohnehin abnormen Perfusionsbedingungen auf Seiten der Mikrozirkulation in Kauf genommen werden. Die Gewebe-Oxygenierung, ermittelt mit der Empho-Technik, zeigte eine weitere Zunahme von Arealen niedriger Oxygenierung, welche unter Kontrollbedingungen nicht zu finden waren. Gebiete mit Oxygenierungswerten wie bei den Kontrollversuchen nahmen rapide ab. Annähernd 75 % der mucosalen Schicht des Ileums zeigten



Werte der Hämoglobin-Sättigung von unter 30 %. Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme der metabolischen Azidose mit einem enormen Anstieg der Plasma-Laktat-Spiegel, einem für die Sepsis prognostisch ungünstigen Faktor.

Diese Folgen der Katecholamin-Substitution für die intestinale Mucosa erhalten unter Berücksichtigung des enormen Energiebedarfs und der Funktion der Mucosa als Barriere eine besondere Bedeutung. Da bereits in einigen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass es im Zuge septischer Erkrankungen zu Schädigungen der Mucosa des Darms in Verbindung mit einer Verschlechterung des intestinalen Blutflusses kommt [6,104,105,122,123], kann diese weitere Verschlechterung der Bedingungen der intestinalen Mucosa unter der Behandlung mit Katecholaminen als enorme Beeinträchtigung der Barrierefunktion gesehen werden und lässt eine weitere Translokation von Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen als wahrscheinlich erscheinen. Somit kann es durch die Katecholaminbehandlung zu einer weiteren Belastung der systemischen Zirkulation durch die Einschwemmung von Bakterien oder bakteriellen Bestandteilen von der Seite des Darmlumens in die systemische Zirkulation kommen. Eine positive Korrelation zwischen einer mucosalen Hypoperfusion, einer intestinalen mucosalen Azidose und einer gesteigerten Inzidenz einer bakteriellen Translokation und Endotoxin-Absorption konnten *Tokuyasu et al.* [121] aufzeigen. Die These, dass eine übermäßige NO-Produktion maßgeblich am Tonus-Verlust unter der Endotoxinämie beteiligt ist, wurde durch die Tatsache unterstützt, dass der nicht-selektive NO-Synthase-Hemmer L-NMMA den Blutdruck in Abwesenheit adrenerger Substanzen wiederherstellen konnte. Dies steht im Einklang mit einigen vorhergehenden Arbeiten, welche ähnliche Ergebnisse zeigten [113,124,127,128]. Die L-NMMA-Behandlung der endotoxischen Versuchstiere führte im Gegensatz zu der Behandlung mit Katecholaminen zu einer Stabilisierung der Stoffwechselbedingungen. Eine weitere Steigerung der metabolischen Azidose und ein Anstieg der Laktat-Bildung traten nicht auf. Die mikrozirkulatorischen Bedingungen der intestinalen Perfusion der Mucosa zeigten weiterhin ein verstärktes Auftreten niedrig oxygenierter Areale im Vergleich zum HbO<sub>2</sub> der Versuchstiere, welche eine alleinige Volumen-Behandlung erhielten. Im Vergleich zu den mit Noradrenalin behandelten

Versuchstieren war diese Verlagerung zu niedrig oxygenierten Arealen jedoch nicht so ausgeprägt. Wie man dies auch erwarten konnte, führte die Behandlung mit dem NO-Synthase-Hemmer zu einer signifikanten Reduktion der Plasma-Nitrit- und Nitrat-Spiegel. Werte wie bei den Kontrolltieren konnten jedoch auch hier nicht erreicht werden. Dies zeigt an, dass bei der für die Wiederherstellung der Makrozirkulation erforderlichen Dosis keine vollständige Blockierung der übermäßigen NO-Bildung erreicht werden konnte. Bei einer Arbeit, welche einen ähnlichen experimentellen Aufbau wie diese Studie hatte, wurde berichtet, dass die Infusion von L-NMMA nach LPS-Gabe die Gefäß-Schäden in Jejunum, Ileum und Kolon reduziert [74]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich durch nähere Betrachtung der Oxygenierung der intestinalen Mucosa, dass die Stabilisierung der Makrohämodynamik durch L-NMMA von einer Verschlechterung der Perfusionsverteilung mit verstärktem Vorkommen von Gebieten niedriger Oxygenierung begleitet war. Dies war nicht so extrem wie bei der Gabe von Noradrenalin, muss jedoch trotz alledem als unvorteilhaft für den Erhalt der Barriere-Funktion der Mucosa angesehen werden.

Weiterhin erwies sich in einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblind-Multicenter-Studie eine nicht-selektive NOS-Hemmung mit 546C88 einer Placebo-Gabe in Bezug auf die Mortalität der Patienten als unterlegen. Häufige Todesursachen der 546C88-Gruppe gegenüber der Placebo-Gruppe waren refraktärer Schock, Störungen der Herzfunktion und Lungenversagen [97]. Allerdings können die Ursachen des unerwartet schlechteren Outcomes der mit 546C88-behandelten Patienten in Phase III der Studie im Vergleich zur Phase II noch nicht eindeutig benannt werden.

Unklarheit besteht über die Anwesenheit der iNOS in den verschiedenen Gefäßarealen. Im Gegensatz zu einigen Autoren, welche ein Fehlen der iNOS in bestimmten Gefäßarealen postulieren, geben andere Arbeiten Hinweise auf ein Vorhandensein der iNOS in den makrozirkulatorischen Gefäßen wie auch in der Mikrozirkulation des Intestinums. So zeigten Arbeiten von *Pulido et al.* ein Fehlen der iNOS in der Pulmonalarterie, da sich nach LPS-Gabe keine veränderte Reaktion der Pulmonalarterie auf  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptor-vermittelte Stimulation durch Phenylephrin zeigte, wohingegen sich eine deutlich verminderte

Empfindlichkeit der Aorta auf Phenylephrin nach LPS-Gabe herausstellte [28]. Zudem gelang der Nachweis des iNOS-Proteins durch Western-Blot und immunhistochemische Methoden zwar in der Aorta, nicht jedoch in der Pulmonalarterie. Selektive iNOS-Inhibition konnte dieses verminderte Ansprechen auf Phenylephrin in der Aorta teilweise wieder beseitigen, wobei die Gabe eines selektiven iNOS-Hemmers in der Pulmonalarterie keinen Effekt zeigte. Diese Ergebnisse decken sich mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit, bei der es nach Gabe des selektiven iNOS-Inhibitors 1400 W weder bei Kontroll- noch bei septischen Versuchstieren zu signifikanten Druckveränderungen im Lungenkreislauf kam (Tabelle 3-2).

Im Gegensatz dazu wird in anderen Arbeiten von einem Ansteigen der iNOS-Expression in der Lunge berichtet und iNOS mRNA wurde nach LPS-Gabe *in vivo* in der Pulmonalarterie nachgewiesen [40,41,42]. Eine iNOS mRNA-Induktion und eine gesteigerte Nitrit-Produktion wurden außerdem bei einer *in vitro*-Stimulation mit einer Mixtur aus Zytokinen und LPS sowohl im pulmonalarteriellen Endothel als auch in glatten Muskelzellen nachgewiesen [43]. Andere Arbeitsgruppen versuchten jedoch vergeblich, das iNOS-Protein bei einer akuten LPS-induzierten Lungen-Schädigung in den glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie mit Hilfe immunhistochemischer Techniken nachzuweisen [102,108].

Griffiths *et al.* zeigten eine iNOS mRNA-Induktion nach LPS-Gabe. Da es in ihrer Arbeit zu einer Steigerung der pulmonalarteriellen Drücke nach selektiver iNOS-Hemmung kam, vermuteten sie eine protektive Rolle der iNOS [40]. Diese Vermutung wiederum konnte sich in anderen Arbeiten, bei denen eine selektive iNOS-Hemmung zu keiner Steigerung der pulmonalarteriellen Drücke führte, nicht bestätigen. Da in verschiedenen anderen experimentellen Modellen der Sepsis intakte Ansprechbarkeiten der Pulmonalarterie auf verschiedene Formen der Vasokonstriktoren nach Endotoxin-Gabe gefunden wurden, wurde dort ein Fehlen einer von der iNOS stammenden NO-Produktion vermutet. Daraus schlossen einige Forschergruppen auf ein unterschiedliches Ansprechen der spezifischen Gefäße auf Schädigungen oder Stress durch phänotypische Heterogenitäten zwischen den verschiedenen vaskulären Zellpopulationen [28].

NELSON *et al.* haben gezeigt, dass LPS-Gabe beim Schaf in einer gehemmten Sensitivität gegenüber Noradrenalin und KCl in der isolierten *Arteria femoralis sup.* resultiert, nicht jedoch im 3. Ast der Pulmonalarterie [117]. LI *et al.* erhielten ähnliche Ergebnisse anhand regionaler Unterschiede in der Antwort isolierter Gefäße beim Kaninchen [45]. Dort hatte LPS keinen Effekt auf die Vasokonstriktion durch Noradrenalin in der *Arteria renalis*, aber eine verminderte Kontraktion in einer isolierten Ohrarterie. SUBA *et al.* fanden außerdem, dass die Vasokonstriktion auf Noradrenalin in der mesenterialen Zirkulation im Schweine-Sepsis-Modell gehemmt war, nicht aber in der Pulmonalarterie [46]. GEIGER *et al.* konnten nachweisen, dass Endothelzellen der Aorta bei Ratten eine bedeutende Induktion der iNOS als Reaktion auf Interferon- $\gamma$ , TNF-alpha und LPS hatten [131]. Im Gegensatz dazu zeigten die mikrovaskulären Endothelzellen eine sehr geringe Induktion der iNOS [131]. Ähnliches fanden MURPHY *et al.*, als sie deutliche Unterschiede der NO-Bildung der Lungen und dermalen Endothelzellen nach IFN- $\gamma$ - und LPS-Gabe zeigten [132]. In laufenden Studien weisen die Zell-Populationen der verschiedenen Organe eine signifikante Heterogenität der iNOS-Induktion auf, was zu einer unterschiedlichen Antwort auf Schädigungen führt.

Eindeutig zeigte sich die Wichtigkeit der iNOS-Expression für die Entstehung der verminderten Ansprechbarkeit der Mesenterialgefäße in einer Arbeit von Boyle *et al.* [13] mit iNOS-Knockout-Mäusen. Bei Mäusen vom Wild-Typ zeigte sich nach LPS-Gabe eine deutliche Verschlechterung der Ansprechbarkeit der Mikrozirkulation der Mesenterialgefäße auf Noradrenalin. Diese konnte nach Gabe des relativ spezifischen iNOS-Inhibitors Aminoguanidin wieder verbessert werden. Die kleinen Gefäße der Mesenterialgefäße der iNOS-Knockout-Mäuse zeigten hingegen nach LPS-Gabe keinerlei Verschlechterungen auf eine Noradrenalin-induzierte Kontraktion.

In der vorliegenden Studie zeigten sich die vorteilhaftesten Effekte durch die Gabe des selektiven iNOS-Inhibitors 1400 W, dessen Selektivität zur iNOS gegenüber den konstitutiven NOS-Isoformen sich in vorigen Studien belegen ließ [10,81]. Die Substanz war in der Lage, den systemischen Blutdruck ähnlich wie L-NMMA wiederherzustellen. Ähnliche Ergebnisse konnten in einigen anderen Arbeiten mit selektiven iNOS-Inhibitoren, wie Aminoguanidin [147], Aminoethylisothiurea

[148], 1-amino-2-Hydroxyguanidin [53] oder Guanidinoethyldisulphid [150], erzielt werden, in welchen sich zudem zum Teil weitere positive Eigenschaften wie eine Verbesserung der Herzleistung, Reduktion biologischer Zeichen eines Organversagens oder einer Gewebhypoxie nachweisen ließen [151,112]. Dies unterstützt die These, dass die Endotoxin-verursachte exzessive NO-Bildung zu großen Teilen einer iNOS-Hochregulation zuzuschreiben ist und dass eine Reduktion der Plasma-Nitrit- und –Nitrat-Spiegel durch Gabe selektiver iNOS-Inhibitoren möglich ist. Diese Interpretation stimmt außerdem mit der Erkenntnis überein, dass die durch 1400 W erreichte Abnahme der Plasma-Nitrit- und Nitrat-Spiegel mit der bei L-NMMA-Gabe beobachteten übereinstimmt.

Durch die Versuche mit Kontrolltieren, welche keine Reaktion auf die Gabe selektiver iNOS-Inhibitoren zeigten, konnte die Rolle der iNOS bei der exzessiven Blutdrucksenkung und Nitratproduktion im Rahmen des septischen Schocks weiterhin belegt werden. Über die Wertigkeit der Plasma-Nitrat- und –Nitrit-Spiegel als prognostische Faktoren für den Verlauf oder das Vorliegen einer Sepsis existieren allerdings Kontroversen. So beschreiben Kirkebøen und Strand in einer Arbeit eine große Variabilität der Nitrat-Spiegel bei Patienten mit schwerer Sepsis [93] und fordern eine Messgröße zur Beurteilung der NO-Produktion, die eine kurze Halbwertszeit hat, unabhängig von der Nierenfunktion ist und ein bekanntes Verteilungsvolumen hat [1]. Keine Kontroversen gibt es bei der Bewertung des Blutdruckes.

Die Wiederherstellung und Stabilisierung des systemischen Blutdrucks durch den iNOS-Inhibitor ereignete sich ohne eine weitere Zunahme der Laktatbildung oder Verschlimmerung einer metabolischen Azidose. Gerade der Wiederherstellung des Blutdruckes kommt eine weitreichende prognostische Bedeutung zu, da sich gezeigt hat, dass der systemische Gefäßwiderstand ein wichtiger prognostischer Faktor bei Patienten im septischen Schock darstellt [55] und eine persistierende arterielle Hypotension, definiert als mittlerer arterieller Blutdruck unter 85 mmHg nach 24-stündiger Behandlung, ein Hauptrisikofaktor für die Mortalität bei Patienten mit septischen Schock ist [149]. Weiterhin zeigte die Analyse der intestinalen mucosalen Sauerstoff-Sättigung kein verstärktes Vorkommen niedrig oxygenierter Gebiete, sondern die gesamte Verteilung der HbO<sub>2</sub>-Werte war dem

Muster der Volumen-behandelten Tiere sehr ähnlich. Diese nützlichen Effekte des iNOS-Inhibitors stimmen gut mit den protektiven Effekten von 1400 W in anderen septischen Modellen der Ratte in Bezug auf das Leakage in der Lunge, dem Ileum, Kolon und der Leber überein [10,141]. Allerdings konnte eine Normalisierung der Gewebe-Oxygenierung der ilealen Mucosa durch den iNOS-Inhibitor durch Vergleich der Werte der Hämoglobin-Oxygenierung mit denen von Kontrolltieren nicht erreicht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass nicht-selektive und selektive iNOS-Inhibition beide zu einer Verbesserung des hypokontraktilen Zustandes nach LPS-Gabe führen. Auch deuten die Verbesserungen der Perfusion der intestinalen Mikrozirkulation durch Gabe von NOS-Inhibitoren auf eine wesentliche Beteiligung der NO-Synthasen bei der Regulation der Mikrozirkulation hin, wobei die überlegenen Resultate des selektiven iNOS-Inhibitors gegenüber der nicht-selektiven NOS-Hemmung die Bedeutsamkeit der iNOS bei der Entstehung der Perfusions-Heterogenität untermauern.

Die Fähigkeit des iNOS-Inhibitors, eine Stabilisierung der Blutdruckverhältnisse ohne Verschlechterung der intestinalen Oxygenierung der Mucosa zu erreichen, charakterisiert diese Substanz als höchst interessantes Werkzeug für die Behandlung der hämodynamischen Instabilität im septischen Schock. Die iNOS-Inhibition stellt sich somit als die bessere Alternative zur nicht-selektiven NOS-Inhibition zur Behandlung der Hämodynamik septischer Patienten dar, nachdem sich in einer großen Phase-III-Studie L-NMMA als dafür ungeeignet herausgestellt hat [72].

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis und der septische Schock stellen im klinischen Alltag nach wie vor einen großen Anteil an der Gesamtmortalität hospitalisierter Patienten. Gegenwärtig existieren nur unbefriedigende Therapieoptionen, welche mit großen Problemen behaftet sind. Um die Hämodynamik und eine ausreichende Organperfusion zu erhalten, muss häufig unter anderem auf die Verabreichung großer Flüssigkeitsvolumina und die Katecholamin-Gabe zurückgegriffen werden. Dabei kommt es zu einer weiteren Verstärkung von Mikrozirkulationsstörungen insbesondere im Gastrointestinaltrakt. Weiterhin ist das septische Krankheitsgeschehen in der Regel mit einer Anzahl metabolischer Störungen verbunden. Es kommt unter anderem zu einer Erhöhung der Plasmalaktatkonzentration, zur Entstehung einer metabolischen Azidose und einer vermehrten Bildung von Stickstoffmonoxid. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell etabliert, welches es gestattet, den Stellenwert unterschiedlicher Therapieregime sowohl auf makro- als auch auf mikrozirkulatorischer Ebene im septischen Schock miteinander zu vergleichen und deren Auswirkungen auf den Säure-Basen-Haushalt zu beurteilen. Somit konnte der Stellenwert der verschiedenen therapeutischen Maßnahmen unter kontinuierlicher Registrierung der Messparameter in vivo beobachtet werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, neue therapeutische Alternativen bei der Behandlung des septischen Schocks zu entwickeln. Dabei konnten die besondere Bedeutung von Stickstoffmonoxid im Rahmen des septischen Krankheitsgeschehens und der Stellenwert der selektiven Hemmung der induzierbaren NO-Synthase gegenüber der Volumen- bzw. der Katecholamin-Gabe sowie der nicht-selektiven NOS-Inhibition dargestellt werden. Eine zentrale Fragestellung war die Wiederherstellung adäquater systemischer Blutdrücke unter Erhalt einer ausreichenden Mikrozirkulation, gemessen in der ilealen Mucosa.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien zeigten sich auch in der vorliegenden Arbeit die besten Ergebnisse unter selektiver Hemmung der induzierbaren NO-Synthase, welche mit dem selektiven iNOS-Inhibitor 1400W durchgeführt wurde. Diese Substanz vermochte es, den Blutdruck ähnlich wie der nicht-selektive NOS-Inhibitor L-NMMA oder Katecholamine wiederherzustellen. Weiterhin zeigte 1400W bei der Messung der ilealen Hämoglobin-Oxygenierung Werte, die denen der Volumen-Behandlung von allen Behandlungsgruppen am nächsten kamen. Es zeigte sich kein verstärktes Vorkommen niedrig oxygenierter Areale, wie dies im besonderen unter der Therapie mit Katecholaminen zu beobachten war, sondern eine allgemeine Verteilung der HbO<sub>2</sub>-Werte ähnlich der Volumen-behandelten Tiere. Die iNOS-Hemmung führte auch zu keiner weiteren Laktatbildung oder einem wesentlichen Fortschreiten der metabolischen Azidose. Dass die gesteigerte NO-Produktion größtenteils der iNOS zugeschrieben werden kann, zeigte auch die Tatsache, dass es unter der Therapie mit dem selektiven iNOS-Inhibitor 1400 W zu einer Abnahme der Plasma-Nitrit- und Nitrat-Spiegel kam, ähnlich der durch L-NMMA. Relevante Einflüsse auf den rechtsventrikulären Druck konnten in keiner der Therapiegruppen gefunden werden.

Insgesamt stellt sich die selektive iNOS-Inhibition im vorliegenden Modell somit als die vorteilhafteste Therapieoption dar und könnte sich in Zukunft als ein nützliches Instrument der Therapie des septischen Schocks erweisen.



## 5 SUMMARY

Sepsis and septic shock still represent a large share of the cumulative mortality in clinical daily routine. To date, therapeutic options are limited by unwanted side effects. In order to restore a sufficient organ perfusion large amounts of volume have to be replaced. In addition adrenergic agents, particularly norepinephrine, are given to maintain adequate blood pressure. As a result of this therapy an increase of disturbances of the microcirculation especially in the mucosa of the bowel can be observed. Furthermore, septic shock contributes to a wide range of metabolic disturbances, such as an increase of plasma lactate concentration, development of metabolic acidosis and enhanced formation of nitric oxide. In the present study, a model to examine different therapeutic regimens including the investigation of the macro- and microcirculation during septic shock has been developed. It was possible to compare these therapy options and to estimate their effects on metabolic regulation.

Increased production of nitric oxide has been previously shown to play an important role in the development of vasodilatation during septic shock. It was possible to demonstrate the relevance of a selective inhibition of NO-synthase in contrast to volume replacement on the one hand and a treatment with epinephrine or non-selective inhibition of NO-synthase on the other hand. The interest of the present work was focused on the recovery of sufficient systemic blood pressure under preservation of adequate tissue oxygenation in the mucosa of the bowel.

In agreement with previous studies best results could be observed with a selective inhibition of an inducible nitric oxide synthase. This inhibition was accomplished by the selective iNOS inhibitor 1400 W. Application of this agent was equally effective in restoring blood pressure as the non-selective nitric oxide synthase inhibition with L-NMMA or norepinephrine. Moreover, the iNOS inhibitor 1400 W was able to cause tissue oxygenation in an ileum mucosal layer which was similar to the effect of a saline infusion. Furthermore, there was no evidence of increased occurrence of low oxygenated areas as observed after norepinephrine treatment.

However, distribution of  $\text{HbO}_2$  in animals treated with 1400 W was similar to that in animals treated with saline infusion only. Selective iNOS-inhibition did not result in increased acidosis and lactate formation. It could be hypothesized that the high levels of NO produced during septic shock may be caused by iNOS itself, since a decrease of plasma nitrite and nitrate levels in animals treated with 1400 W was similar to that observed with the use of the non-selective nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA. No significant influences in right ventricular systolic pressures occurred under any therapeutic regiment.

In conclusion use of selective iNOS-inhibition in this model of septic shock enabled us to investigate the most beneficial effects of several therapy options. In the future, selective iNOS-inhibition may become an interesting tool to treat septic shock restoring a stabilization of blood pressure while avoiding the deterioration of the intestinal mucosal oxygenation.

## 6 LITERATUR

1. KIRKEBØEN KA AND STRAND A (1999) The role of nitric oxide in sepsis – an overview. *Acta Anaesthesiol Scand*; 43: 275-288.
2. HORI M, KITA M, TORIHASHI S, MIYAMOTO S, WON KJ, SATO K, OZAKI H AND KARAKI H (2001) Upregualtion of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. *Am J Phsiol Gastrointest Liver Physiol*; 280: G930-G938.
3. ROSSELET A, FEIHL F, MARKERT M, GNAEGI A, PERRET C AND LIAUDET L (1998) Selective iNOS inhibition is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock. *Am J Respir Crit Care Med*; 157:162-170.
4. SCOTT JA AND MCCORMACK DG (1999) Selective in vivo inhibition of inducible nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. *J Appl Physiol*; 86(5): 1739-1744.
5. TEMMESFELD-WOLLENBRÜCK B, SZALAY A, MAYER K, OLSCHESKI H, SEEGER W AND GRIMMINGER F (1998) Abnormalities of gastric mucosal oxygenation in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*; 157: 1586-1592.
6. K.MAYER K, TEMMESFELD-WOLLENBRÜCK B, FRIEDLAND A, OLSCHESKI H, REICH M, SEEGER W AND GRIMMINGER F (1998) Severe microcirculatory abnormalities elicited by E.coli hemolysin in the rabbit ileum mucosa. *Am J Respir Crit Care Med*; 160: 1171-1178.
7. WANG D, WIE J, HSU J, JAU JC, LIEU MW, CHAO TJ AND CHEN HL (1999) Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *J Biomed Sci*; 6: 28-35.
8. KAMOSINSKA B, RADOMSKI A, MAN SFP, RADOMSKI MW AND DUSZYK M (2000) Role of inducible nitric-oxide synthase in regulation of whole-cell current in lung epithelial cells. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics JPET*; 295: 500-505.

9. NUSSLER AK, BILLIAR TR, LIU ZZ AND MORRIS SM JR (1994) Coniduction of nitric oxide synthase and argininosuccinat synthetase in a murine macrophage cell line. Implication for regulation of nitric oxide production J BIOL CHEM , 269: 1257-1261.
10. GARVEY EP, OPLINGER JA, FURFINE ES, KIFF RJ, LASZLO F, WHITTLE BJR AND KNOWLES RG (1997) 1400 W is a slow, tight binding and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. Journal of biological chemistry; 272(8): 4959-4963.
11. MORI M AND GOTOH T (2000) Regulation of nitric oxide production by Arginine metabolic enzymes. Biochemical and biophysical research communications; 275: 715-719.
12. LORTIE MJ, ISHIZUKA S, SCHWARTZ D AND BLANTZ RC (2000) Bioactive products of Arginine in sepsis: tissue and plasma composition after LPS and iNOS blockade. Am J Physiol; 278: C1191-C1199.
13. BOYLE WA, PARVATHANENI LS, BOURLIER V, SAUTER C, LAUBACH VE AND JP COBB (2000) iNOS gene expression modulates microvascular responsiveness in endotoxin-challenged mice. Circulation Research; 87: e18-e24.
14. FREEMAN SL AND MACNAUGHTON WK (2000) Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol; 278: G243-G250.
15. HOLZMANN A, MANKTELOW C, WEIMANN J, BLOCH KD AND ZAPOL WM (2001) Inhibition of lung phosphodiesterase improves responsiveness to inhaled nitric oxide in isolated-perfused lung from rats challenged with endotoxin. Intensive Care Med; 27: 251-257.
16. BOER R, ULRICH WR, KLEIN T, MIRAU B, HAAS S AND BAUR I (2000) The inhibitory potency and selectivity of Arginine substrate site nitric-oxide synthase inhibitors is solely determined by their affinity toward the different isoenzymes. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Mol Pharmacol; 58: 1026-1034.

17. KOARAI A, ICHINOSE M, SUGIURA H, YAMAGATA S, HATTORI T AND SHIRATO K (2000) Allergic airway hyperresponsiveness and eosinophil infiltration is reduced by a selective iNOS inhibitor, 1400 W, in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*; 13: 267-275.
18. McMILLAN K, ADLER M, AULD DS, BALDWIN JJ, BLASKO E, BROWNE LJ, CHELSKY D, DAVEY DOLLE D, EAGAN KA, ERICKSON S, FELDMAN RI, GLASER CB, MALLARI C, MORRISSEY MM, OHLMEYER MHJ, PAN G, JF PARKINSON, PHILLIPS GB, POLOKOFF MA, SIGAL NH, VERGONA R, WHITLOW M, YOUNG TA AND DEVLIN JJ (2000) Allosteric inhibitors of inducible nitric oxide synthase dimerization discovered via combinatorial chemistry. *PNAS*; 97(4): 1506-1511.
19. RAMESH B AND GRIFFITH OW (1998) Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase. *Current Opinion in Chemical Biology*; 2: 491-500
20. FERDINANDY P, DANIAL H, AMBRUS I, ROTHERY RA AND SCHULZ R (2000) Peroxynitrite is a major contributor to cytokine-induced myocardial contractile failure. *Circulation Research*; 87: 241-247.
21. LAMARQUE AND WHITTLE BJR (2001) Increase in gastric intramucosal hydrogen ion concentration following endotoxin challenge in the rat and the actions of nitric oxide synthase inhibitors. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 28: 164-168.
22. SHOEMAKER WC, WO CC, YU S, FARJAM F AND THANGA THURDAI D (2000) Invasive and noninvasive haemodynamic monitoring of acutely ill sepsis and septic shock patients in the emergency department. *Eur J Emerg Med*; 7(3): 167.
23. GRANDEL U, SIBELIUS U, SCHRICKEL J, SCHMIDT D, BUERKE M, FINK L, BOURNELIS E, HEEP M, MAYER K, BOHLE RM, SEEGER W AND GRIMMINGER F (2001) Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -toxin. *Crit Care Med*; 29(1).
24. FARQUHAR I, MARTIN CM, LAM C, POTTER R, ELLIS CG AND SIBBALD WJ (1996) Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *Journal of Surgical Research*; 61: 190-196.

25. SPAIN DA, WILSON MA, KRYSZTOPIK RJ, MATHESON PJ AND RN GARRSION (1997) Differential intestinal microvascular dysfunction occurs during bacteremia. *Journal of surgical research*; 67: 67-71.
26. SCHMIDT H, SECCHI A, WELLMANN R, BACH A, BÖHRER H, GEBHARD MM AND MARTIN E (1996) Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *Journal of surgical research*; 61: 521-526.
27. CROUSER ED, JULIAN MW, WEINSTEIN DM, FAHY RJ AND BAUER JA (2000) Endotoxin-induced ileal mucosal injury and nitric oxide dysregulation are temporally dissociated. *Am J Respir Crit Care Med*; 161: 1705-1712.
28. PULIDO EJ, SHAMES BD, FULLERTON DA, SHERIDAN BC, SELZMAN CH, GAMBONI-ROBERTSON F, BENSARD DD AND MCINTYRE RC (2000) Differential inducible nitric oxide synthase expression in systemic and pulmonary vessels after endotoxin. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*; 278: R1232-R1239.
29. ESKANDARI MK, KALFF JC, BILLIAR TR, LEE KKW AND BAUER AJ (1999) LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am J Physiol*; 277: G478-G486.
30. BODMANN KF, VOGEL F, GRANINGER WG, KRESKEN M, PAAR WD, PETERS G, RIETSCHEL E, SEIFERT H, SHAH P, SÖRGEL F, STILLE W, TAUCHNITZ C, TRAUTMANN M, ULLMANN U, WACHA H AND WIEDEMANN B (2001) Antimikrobielle Therapie der Sepsis. *Chemotherapie Journal*.
31. GOCAN C, SCOTT JA AND TYML K (2000) Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 278: H1480-H1489.
32. BONE RC, BALK RA, CERRA FB, DELLINGER RP, FEIN AM, KNAUS WA, SCHEIN RMH AND SIBBALD WJ (1992) Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*; 101: 1644-1655.
33. MARSH CB AND WEWERS MD (1996) The pathogenesis of sepsis. Factors that modulates the response to gram-negative bacterial infections. *Clin Chest Med*; 17: 183-197

34. BAKER CH AND SUTTON ET (1993) Arteriolar endothelium-dependent vasodilatation occurs during Endotoxin shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 264: H1118-H1123.
35. HOLLENBERG SM, CUNNION RE AND ZIMMERBERG J (1993) Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 264: H660-H663.
36. LÜBBE AS, GARRISON RN, CRYER HM, ALSIP NL AND HARRIS PD (1992) EDRF as a possible mediator of sepsis-induced arteriolar dilatation in skeletal muscle. *Am J Heart Circ Physiol*; 262: H880-H887.
37. SCOTT JA, MACHOUN M AND MCCORMACK DG (1996) Inducible nitric oxide synthase and vascular reactivity in rat thoracic aorta: effect of aminoguanidine. *J Appl Physiol*; 80: 271-277.
38. YOSHIZUMI M, PERELLA MA, BURNETT JC AND LEE ME (1993) Tumor necrosis factor down-regulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Research*; 73: 205-209.
39. PERKINS DJ AND KNISS DA (1999) Blockade of nitric oxide formation down-regulates cyclooxygenase-2 and decreases PGE<sub>2</sub> biosynthesis in macrophages. *J Leukoc Biol*; 65: 782-799.
40. GRIFFITHS MJD, LIU S, CURZEN NP, MESSENT M AND EVANS TW (1995) In vivo treatment with endotoxin induces nitric oxide synthase in the rat main pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 268: L509-L518.
41. KNOWLES RG, MERRETT M, SALTER M AND MONCADA S (1990) Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J*; 270: 833-836.
42. SZABO C (1995) Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horizon*. 3: 2-32.

43. NAKAYAMA DK, GELLER DA, LOWENSTEIN CJ, CHERN HD, DAVIES P, PITT BR, SIMMONS RL AND BILLIAR TR (1992) Cytokines and lipopolysaccharid induce nitric oxide synthase in cultured rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 7: 471-476.
44. XIE Q, KASHIWABARA Y AND NATHAN C (1994) Role of Transcription Factor NF- $\kappa$ B/Rel in Induction of Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem*; 269: 4705-4708.
45. LI T, CROCE K AND WINQUIST RJ (1992) Regional differences in the effects of septic shock on vascular reactivity in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*; 261: 959-963.
46. SUBA EA, MCKENNA TM AND WILLIAMS TJ (1992) Differential contractile responses of mesenteric and pulmonary artery segments to norepinephrine and phorbol ester in the septic pig. *Circ Shock*; 37: 164-168.
47. CURRAN RD, FERRARI FK, KISPERS PH (1991) Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J*; 5: 2085-2092.
48. HARBRECHT BG, BILLIAR TR, STADLER J (1992) Nitric oxide serves to reduce hepatic damage during murine endotoxemia. *Crit Care Med*; 20: 1568-1574.
49. BATESON AN, JAKIWICZYK OM AND SCHULTZ R (1996) Rapid increase in inducible nitric oxide synthase gene expression in the heart during endotoxemia. *Eur J Pharmacol* ; 303: 141-144.
50. BALLIGAND J, UNGUREANU R, KELLY RA (1993) Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditions medium. *J Clin Invest*; 91: 2314-2319.
51. WHITWORTH PW, CRYER HM, GARRISON RN, BAUMGARTEN TE AND HARRIS PD (1989) Hypoperfusion of the intestinal microcirculation without decreased cardiac output during live escherichia coli sepsis in rats. *Circ Shock*; 27: 111.
52. THEUER CJ, WILSON MA, STEEB GD AND GARRISON RN (1993) Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ Shock*; 40: 61.



53. RUETTEN H, SOUTHAN GJ, ABATE A AND THIEMERMANN C (1996) Attenuation of endotoxin-induced multiple organ dysfunction by 1-amino-2-hydroxy-guanidine, a potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*; 118: 261-270.
54. SZÁBO C, SOUTHAN GJ AND THIEMERMANN C (1994) Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91: 12472-12476.
55. GROENEVELD ABJ, BRONSVELD W AND THIJLS LG (1986) Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery*; 99:140-153.
56. DAI LJ, BROOKES PS, DARLEY-USMAR VM AND ANDERSON PG (2001) Bioenergetics in cardiac hypertrophy: mitochondrial respiration as a pathological target of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 281:H2261-H2269.
57. SEN R AND BALTIMORE D (1986) Multiple nuclear factors interact with immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*; 46: 705-716.
58. MANIATIS T (1997) Catalysis by a multiprotein I $\kappa$ B complex. *Science*; 278: 818-9.
59. CHEN ZJ, PARENT L, MANIATIS T (1996) Site-specific phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*; 84: 853-62.
60. REGNIER CH, SONG HY, GAO X, GOEDDEL DV, CAO Z, ROTHE M (1997) Identification and characterization of an I $\kappa$ B kinase. *Cell*; 90: 373-83.
61. MALININ NL, BOLDIN MP, KOVALENKO AV, WALLACH D (1997) MAP3K-related kinase involved in NF- $\kappa$ B induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*; 385: 540-4.
62. DOWNEY JS AND HAN J (1998) Cellular activation mechanisms in septic shock. *Frontiers in bioscience*; 3: d468-476.
63. HOBBS AJ AND MONCADA S (1999) Inducible nitric oxide synthase and inflammation in inducible enzymes in the inflammatory response. Willoughby DA and Tomlinson A, eds. Birkhauser Verlag, Basel: 31-54.

64. CONNELLY L, PALACIOS-CALLENDER M, AMEIXA C, MONCADA S AND HOBBS AJ (2001) Biphasic regulation of NF-kB activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *The Journal of Immunology*; 166: 3873-3881.
65. SWIERKOSZ TA, MITCHELL JA, WARNER TD, BOTTING RM AND VANE JR (1995) Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. *Br J Pharmacol*; 114: 1335.
66. ASSREUY J, CUNHA FQ, LIEW FY AND MONCADA S (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol*; 108: 833.
67. ASSREUY J AND MONCADA S (1992) A perfusion system for the long-term study of macrophage activation. *Br J Pharmacol*; 107: 317.
68. TOGASHI H, SASAKI M, FROHMAN E, TAIRA E, RATAN RR, DAWSON TM AND DAWSON VL (1997) Neuronal nitric oxide synthase regulates nuclear factor kB activity and immunologic nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94: 2676.
69. PENG HB, LIBBY P AND LIAO JK (1995) Induction and stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  by nitric oxide mediates inhibition of NF-kB. *J Biol Chem*; 270: 14214.
70. DIAZ-CAZORLA M, PEREZ-SALA D AND LAMAS S (1999) Dual effect of nitric oxide donors on cyclooxygenase-2 expression in human mesengial cells. *J Am Soc Nephrol*; 10: 943.
71. DE CATERINA R, LIBBY P, PENG HB, THANNICKAL VJ, RAJAVASHISTH TB, GIMBRONE MA, SHIN WS AND LIAO JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*; 96: 60.
72. GROVER R, LOPEZ A AND LORENTE J (1999). Multi-center, randomized, placebo-controlled, double blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med*; 27.
73. THOMASSEN MJ, BUHROW LT, CONNORS MJ, KANEKO FT, ERZURUM SC AND KAVURU MS (1997) Nitric oxide inhibits inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 17:279.

74. LASZLO F, WHITTLE B J AND MONCADA S (1994). Time-dependent enhancement or inhibition of endotoxin-induced vascular injury in rat intestine by nitric oxide synthase inhibitors. *Br J Pharmacol*; 111:1309-1315.
75. SCHROEDER RA, CAI C AND KUO PC (1999) Endotoxin-mediated nitric oxide synthesis inhibits IL-1 $\beta$  gene transcription in ANA-1 murine macrophages. *Am J Physiol*; 277:C523.
76. SPIECKER M, PENG HB AND LIAO JK (1997) Inhibition of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by nitric oxide involves the induction and nuclear translocation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *J Biol Chem*; 272:30969.
77. KUBES P, SUZUKI M AND GRANGER DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA*; 88:4651.
78. SHEFFLER LA, WINK DA, MELILLO G AND COX GW (1995) Exogenous nitric oxide regulates IFN- $\gamma$  plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J Immunol*; 155:886.
79. OCHOA JB, UDEKWU AO, BILLIAR TR ET AL. (1991) Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg*; 214:621-626.
80. HABIB A, BERNARD C, LEBRET M, CREMINON C, ESPOSITO B, TEDGUI A AND MACLOUF J (1997) Regulation of the expression of cyclooxygenase-2 by nitric oxide in rat peritoneal macrophages. *J Immunol*; 158:3845.
81. GUZMAN N, FANG M, TANG S, INGELFINGER J AND CARG L (1995). Autocrine inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by nitric oxide in mouse proximal tubule epithelial cells. *J Clin Invest*; 95:2083-2088.
82. LANDER HM, SEHAJPAL P, LEVINE DM AND NOVOGRODSKY A (1993) Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol*; 150:1509.
83. ITO CY, KAZANTSEV AG AND BALDWIN JR. AS (1994) Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucl Acids Res*; 22: 3787-3792.

84. COGSWELL PC, SCHEINMAN RI AND BALDWIN JR AS (1993) Promoter of the NF-kappa B p50/p105 gene. Regulation by NF-kappa B subunits and by c-REL. J Immunol; 150: 2794-27804.
85. BLACKWELL TS AND CHRISTMAN JW (1997) The role of nuclear factor- $\kappa$ B in cytokine gene regulation. Am J Respir Cell Mol Biol; Volume 17, Nummer 1.
86. WANG P, WU P, SIEGEL MI, EGAN RW AND BIILLAH MM (1995) Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in human monocytes. J Biol Chem; 270: 9558-9563.
87. SCHOTTMÜLLER H (1914) Wesen und Behandlung der Sepsis. Verh Dtsch Ges Inn Med; 31: 257-280.
88. SCHUSTER HP (1996) Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. Berlin Heidelberg New York, Springer- Verlag: 23-42.
89. BAYDOUN AR, BOGLE RG, PEARSON JP AND MANN GE (1993) Selective inhibition by dexamethasone of induction of NO synthase, but not of induction of L-arginine transport, in activated murine macrophage J 774 cells. Br J Pharmacol; 110: 1401-1406.
90. LIU SF, ADCOCK IM, OLD RW, BARNES PJ AND EVANS TW (1996) Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. Crit Care Med; 24: 1219-1225.
91. NOUE Y, BODE BP AND SOUBA WW (1994) Hepatic Na<sup>+</sup> independent amino acid transport in endotoxemic rats: evidence for selective stimulation of arginine transport. Shock; 2: 164.172.
92. WILEMAN SM, MANN GE AND BAYDOUN AR (1995) Induction of L-arginine transport and nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells: synergistic actions of pro-inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. Br J Pharmacol; 116: 3243-3250.

93. STRAND ØA, GRANLI T, DAHL R, BØCKMANN OL AND KIRKEBØEN KA (1997) Serum nitrate levels in patients with severe sepsis and renal failure. Clin Intensive Care; 8:52-57.
94. KASHIWABARA XY AND NATHAN Y (1994) Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. J Biol Chem; 269(7): 4705-8.
95. GRISCAVAGE JM, WILK S AND IGNARRO LJ (1996) Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci; USA. 93(8): 3308-12.
96. SCHEINMANN I, GUALBERTO A, JEWELL CM, CIDLOWSKI JA AND BALDWIN JR AS (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. Mol Cell Biol; 15(2): 943-53.
97. LOPEZ A, LORENTE J A, STEINGRUB J, BAKKER J, MCLUCKIE A, WILLATTS S, BROCKWAY M, ANZUETO A, HOLZAPFEL L, BREEN D, SILVERMAN M S, TAKALA J, DONALDSON J, ARNESON C, GROVE G, GROSSMAN S AND GROVER R (2004). Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock. Crit Care Med; 32(1):21-30.
98. RAY A AND PREFONTAINE KE (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. Proc Natl Acad Sci USA; 91(2): 752-6.
99. AUPHAN N, DiDONATO JA, ROSETTE C, HELMBERG A AND KARIN M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. Science; 270(5234): 286-90.
100. SCHEINMAN RI, COGSWELL PC, LOFQUIST AK AND BALDWIN JR AS (1995) Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. Science. 270(5234): 283-6.
101. CROUSER ED, JULIAN MW AND DORINSKY P M (1999) Ileal VO<sub>2</sub>-DO<sub>2</sub> alterations induced by endotoxin correlate with severity of mitochondrial injury. Am J Respir Crit Care Med; 160:1347-1353.

102. NUMATA M, SUZUKI S, MIYAZAWA N, MIYASHITA A, NAGASHIMA Y, INOUE S, KANEKO T AND OKUBO T (1998) Inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents LPS-induced acute lung injury in dogs. *J Immunol*; 160: 3031-3037.
103. PODEROSO JJ, CARRERAS MC, LISDERO C, RIOBO N, SCHOPFER F AND BOVERIS A (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*; 328: 85-92.
104. JONES WG, MINEI JP, BARBER AE, FAHEY TJ AND SHIRES GT (1991) Splanchnic vasoconstriction and bacterial translocation after thermal injury. *Am J Physiol*; 261: H 1190.
105. CHIU CJ, McARDLE AH, BROWN R, SCOTT HJ AND GURD FN (1970) Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I .A. morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*; 101: 478.
106. PODEROSO JJ, PERALTA J, LISDERO C, CARRERAS M, RADISIC M, SCHOPFER F, CADENAS E AND BOVERIS A (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol*; 274: C112-C119.
107. MORIN MJ, UNNO N, HODIN RA AND FRANK MP (1998) Differential expression of inducible nitric oxide synthase messenger RNA along the longitudinal and crypt-villus axes of the intestine in endotoxemic rats. *Crit Care Med*; 26:1258-1264.
108. KBOZIK L, BREDT DS, LOWENSTEIN CJ, PRAZEN J, GASTON B, SUGARBAKER D AND STAMLER JS (1993) Nitric oxide synthase in human and rat lung: immunocytochemical and histochemical localization. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 9: 371-377.
109. DUVALL MD, ZHU, FULLER CM AND MATALON S (1998) Peroxynitrite inhibits amilorid-sensitive Na<sup>+</sup> currents in *Xenopus* oocytes expressing  $\alpha\beta\gamma$ -rENaC. *Am J Physiol*; 274: C1417-C1423.

110. AVONTUUR JA, BIEWANGA M, BUIK SC, KANKAI KJ AND BRUINIG HA (1988) Pulmonary hypertension and reduced cardiac output during inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Shock* ; 9: 451-454
111. VALLET B, CURTIS SE, LUND N AND CAIN SM (1994) Gut and muscle tissue pO<sub>2</sub> in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *Ann. Franc d'Anesthésie et de Reanimation*. 13: 675.
112. LIAUDET L, FISHMAN D, MARKERT M, PERRET C AND FEIHL F (1997) L-Canavanine improves organ function and tissue adenosine triphosphate levels in rodent endotoxemia. *Am J Respir Crit Care med*; 155:1643-1648.
113. JULOU-SCHAEFFER G, GRAY GA, FLEMMING I, SCHOTT C, PARRATT JR AND STOCLET JC (1990) Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-Arginin pathway. *Am J Phsiol Heart Circ Phsiol*; 259: H1038-H1043.
114. MACMICKING JD, NATHAN C, HOM G, CHARTRAIN N, FLETCHER DS, TRUMBAUER N, STEVENS K, XIE QW, SOKOL K, HUTCHINSON N, HOWARD C AND MUDGETT JS (1995) Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell*; 81: 641-650.
115. FAGGIONI R, GATTI S, DEMITRI MT, DELGADO R, ECHTENACHER B, GNOOCHI P, HEREMANS H AND GHEZZI P (1994). Role of xanthine-oxidase and reactive oxygen intermediates in LPS-induced and TNF-induced pulmonary edema. *J Lab Clin Med*; 123:394-399.
116. EVANS TE, CARPENTER A, SILVA A AND COHEN A (1994) Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram negative sepsis. *J Inf Dis*; 169: 343-349.
117. NELSON S, STEWARD RH, TRABER L AND TRABER D (1991) Endotoxin induced alterations in contractility of isolated blood vessels from sheep. *Am J Phsiol Heart Circ Phsiol*; 260: H1790-H1794.
118. CHAMULITRAT W, SKREPNIK NV AND SPITZER JJ (1996) Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock*; 5:217-222.

119. TRACEY WR, TSE J AND CARTER G (1995) Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*; 272: 1011-1015.
120. HOLLENBERG SM, BROUSSARD M, OSMAN J AND PARILLO JE (2000) Increased microvascular reactivity and improved mortality in septic mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Circ Res*; 86: 774-778.
121. TOKYAY R, ZEIGLER ST, TRABER DL, STOTHERT JL, LOICK HM, HEGGERS JP AND HERADON DN (1993) Postburn gastrointestinal increases bacterial and endotoxin translocation. *J Appl Physiol*; 74:1521.
122. FINK MP (1991) Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma and sepsis. *Crit Care Med*; 19: 627-641.
123. MEAKINS JL AND MARSHALL JC (1986) The gastrointestinal tract: the "motor" of MOF. *Arch Surg*; 121: 197-201.
124. LORENTE JA, LANDIN L, DEPABLO R, RENES E AND LISTE D (1993) L-Arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med*; 21: 1287-1295.
125. SCHUMACKER PT, KAZAGLIS J, CONNOLLY HV, SAMSEL RW, O'CONNOR MF AND UMANS JG (1995) Systemic and gut O<sub>2</sub>-extraction during endotoxemia: role of nitric oxide synthesis. *Am J Respir Crit Care Med*; 151:107-115.
126. WANG W, SUZUKI Y, TANIGAKI T, RANK DR AND RAFFIN TA (1994) Effect of the NADPH oxidase inhibitor on systemic lung injury in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*; 150:1449-1452.
127. LORENTE JA, LANDIN L, RENNES E, DEPABBLO R, JORGE P, RODENA E, LISTE D (1993) Role of nitric oxide in the hemodynamic changes of sepsis. *Crit Care Med*; 21: 759-767.
128. PETROS A, LAMB G, LEONE A, MONCADA S, BENNET D AND VALANCE P (1994) Effect of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. *Cardiovasc Res*; 28: 34-39.



129. BIANCHI M, ULRICH P, BLOOM O, MEISTRELL M, ZIMMERMANN GA, SCHMIDTMAYEROVA H, BUKRINSKY M, PONNELLY T, BUCALA R, SHERRY B, MANOGUE KR, TORTOLANI AJ, CERAMI A AND TRACEY KJ (1995) An inhibitor of macrophage arginine transport and nitric oxide production (CNI-1493) prevents acute inflammation and endotoxin lethality. *Mol Med*; 1: 254-266.
130. STEVENS BR, KAKUDA DK, YU K, WATERS M, VO CB AND RAIZADA MK (1996) Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *J Biol Chem*; 271: 24017-24122.
131. GEIGER M, STOE A, MASON SN, OLDHAM KT AND GUICE KS (1997) Differential nitric oxide production by microvascular and macrovascular endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 273: L275-281.
132. MURPHY H, WARNER R; BAKOPOULOS N; DAME M, VARANI J AND WARD P (1999) Endothelial cell determinants of susceptibility to neutrophil-mediated killing. *Shock*; 12: 111-117.
133. PATRICK A, BAEUERLE AND HENKEL T (1994) Function and Activation of NF-Kappa B in the Immune System. *Annu Rev Immunol*; 12: 141-179
134. KIM RG, SHIN KM, KIM Y K, JEONG HJ, CHOI JW, PARK HJ AND LEE T (2003) Inhibition of methanol extract from the aerial parts of saurusus chinensis on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandine E2 production from murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biol Pharm Bull*; 26(4): 481-486.
135. CROFFORD LJ, TAN B, MCCARTHEY CJ AND HLA T (1997) Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2-expression by interleukine-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum*; 40(2): 226-236.
136. FRANK KH, KESSLER M, APPELBAUM K AND DÜMLER W (1989) The Erlangen mirkolightguide spectrophotometer EMPHO I. *Phys Med Biol*; 34: 1883-1900.
137. MATSUMURA M, KAKISHITA H, SUZUKI M, BANBA N AND HATTORI Y (2001) Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by inhibiting NF-kappaB in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*; 69(9):1067-77.

138. HASIBEDER W, GERMANN R, WOLF HJ, HAISJACKL M, HAUSDORFER H, RIEDMAN B, BONATII J, GRUBER E, SCHWARZ B, WALDENBERGER P, FRIESENECKER B AND FURTNER B (1996) Effects of short-term endotoxemia and dopamine on mucosal oxygenation in porcine jejunum. *Am J Physiol*; 270: G667-G675.
139. BECKMANN JS AND KOPPENOL WH (1996) Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol*; 271:C1427-C1437.
140. FALK A, REDFORS S, MYRVOLD H AND HAGLUND U (1985) Small intestinal mucosal lesions in feline septic shock: a study on the pathogenesis. *Circ Shock*; 17: 327.
141. WRAY GM, MILLAR CG, HINDS CJ AND THIEMERMANN C (1998) Selective inhibition of the activity of inducible nitric oxide synthase prevents the circulatory failure, but not the organ injury/dysfunction, caused by endotoxin. *Shock*; 9:329-335.
142. LANDOW L AND ANDERSEN LW (1994) Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta Anaesthesiol Scand*; 38: 626.
143. VALLET B, LUND N, CURTIS SE, KELLY D AND CAIN SM (1994) Gut and muscle tissue  $pO_2$  in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J Appl Physiol*; 76: 793-800.
144. CLARK ES AND COLLATOS C (1990) Hypoperfusion of the small intestine during slow infusion of a low dosage of endotoxin in anaesthetized horses. *Cornell Vet.* 80: 163.
145. SZABO C, MITCHELL JA, THIEMERMANN C AND VANE JR (1993) Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. *Br J Pharmacol*; 108: 786-792.
146. YOSHIKAWA D, SHIGA T, SAITO S, MORITA T, IMAI T AND GOTO F (1998) Platelet-activating factor receptor antagonist attenuates endotoxin-induced hyporeactivity in the pithed rat. *Eur J Pharmacol* ; 342:241-245.
147. WU CC, CHEN SJ, SZABO C, THIEMERMANN C AND VANE JR (1995) Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxin shock. *Br J Pharmacol*; 114: 1666-1672.

148. THIEMERMANN C, RUETTEN H, WU CC AND VANE JR (1995) The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol*; 116:2845-2851.
149. BERNARDIN G, PRADIER C, TIGER F, DELOFFRE P AND MATTEI M (1996) Blood pressure and arterial lactate level are early predictors of short-term survival in human septic shock. *Intensive Care Med*; 22:17-25.
150. SZABO C, BYRK R, ZINGARELLI B, SOUTHAN GJ, GAHMAN TC, SALZMAN AL AND WOLFF DJ (1996) Pharmacological characterization of guanidine-ethyldisulphide (GED), a novel inhibitor of nitric oxide synthase with selectivity towards the inducible isoform. *Br J Pharmacol*; 118:1659-1668.
151. LIAUDET L, FEIHL F, ROSSLET A, MARKERT M AND PERRET C (1996) Beneficial effects of L-Canavanine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, during rodent endotoxemia. *Clin Sci*; 90:369-377.
152. FLÖDSTROM M, NIEMANN A, BEDOYA FJ, MORRIS JR SM, EIZIRIK DL (1995) Expression of the citrulline-nitric oxide cycle in rodent and human pancreatic beta-cells: induction of argininosuccinate synthetase by cytokines. *Endocrinology*, 136: 3200-3206.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Seeger danke ich für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Ralph Schermuly, der mir durch seine fachliche Kompetenz und seinen stets währenden Optimismus jederzeit Motivation gespendet hat und mit dem ich mich durch seine Art freundschaftlich verbunden fühle. Danken möchte ich ihm auch für seine Geduld und sein Vertrauen, mit denen er mir an schlechten Tagen geholfen hat, weiterzumachen und nie den Glauben zu verlieren. Nicht zuletzt danke ich ihm für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der vorliegenden Arbeit. Er hat mich sehr gut in das wissenschaftliche Arbeiten eingeführt und meiner Arbeit durch stets neue Ideen gute Impulse gegeben und dadurch eine sehr produktive Spannung aufrechterhalten.

Des Weiteren danke ich meiner Lebensgefährtin Kathrin Michel, die mir immer eine große Hilfe gewesen ist und vor deren fachlichen Wissen und Genauigkeit ich großen Respekt habe. Durch sie wurde diese Arbeit eine runde Sache, denn sie stand mir privat wie beruflich immer tatkräftig zur Seite.

Und natürlich nicht zu vergessen danke ich meiner Familie, die mir mein Studium erst ermöglicht hat und es mir sehr leicht gemacht hat, dies alles so zu schaffen. Leichter als sie es hatte. Im Besonderen gedenke ich dabei meinem Großvater Dr. med. H. Maring, der mir durch sein Lebenswerk immer Vorbild war und sein wird. Mit seiner wunderbaren Frau, meiner geliebten Großmutter, war er mir der Rückhalt, den man braucht, um seinen Platz im Leben zu finden.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Angaben

Geburtstag	17.02.1976
Geburtsort	Telgte
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1982-1986	Grundschule in Bonn
1986-1995	Gesamtschule in Bonn-Beuel
1986-1996	Zivildienst in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

## Ausbildung

April 1997	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität in Giessen
März 1999	Physikum
März 2000	1. Staatsexamen
April 2000- Dezember 2001	Experimenteller Teil der Doktorarbeit am Institut für Innere Medizin
März 2002	2. Staatsexamen
Oktober 2002	Beginn des praktischen Jahres:
Oktober 2002 bis Februar 2003	Chirurgie im Spital Limmattal, Zürich
Februar 2003- Juni 2003	Innere Medizin Klinikum Dortmund
Juni 2003- Oktober 2003	Anästhesiologische Abteilung Klinikum Dortmund
April 2004-Oktober 2004	Antritt einer Stelle als Arzt im Praktikum in der Medizinischen Poliklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Oktober 2004	Assistenzarzt in der Medizinischen Poliklinik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

## **Famulaturen**

Juli-August 1999

Pathologisches Institut der Charité Berlin

Juli-August 2000

Innere Medizin an der Justus-Liebig-Universität in  
Giessen

Juli-August 2001

Allgemeinärztliche Praxis auf Teneriffa

Sept.-Oktober 2001

Urologisches Institut an der Justus-Liebig-  
Universität in Giessen

## **Selbstständige Erstellung der Promotion**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“